

Université Joseph Fourier
Grenoble I
Laboratoire de Spectrométrie Physique

Présenté par

Cyrille VEZY

pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER

Discipline : Physique pour les Sciences du Vivant

dirigée par

Dr. Annie VIALLAT

Sujet de la Thèse :

Dynamique de billes d'agarose et de vésicules géantes en adhésion sous un écoulement de cisaillement.

soutenue le 7 septembre 2007 devant le jury composé de :

Mme Annie VIALLAT	Directrice de thèse
M. Franz BRUCKERT	Président du jury
M. Pierre BONGRAND	Examineur
M. Carlos MARQUES	Rapporteur
M. Pierre NASSOY	Rapporteur
Mme Gladys MASSIERA	Examinatrice

*Je dédie cette thèse à mes grands-parents,
qui nous ont quittés beaucoup trop tôt,
et à mon futur petit monstre.*

Mercis

Je vais me lancer dans la délicate tâche des remerciements. Délicate, car j'espère n'oublier personne. Je vais essayer de faire court mais bon il y a tellement de personnes qui ont participé directement ou indirectement à ce travail, qu'en fait ça va être long.

Je souhaite remercier en premier lieu messieurs Pierre Nassoy et Carlos Marquez d'avoir eu la gentillesse d'être les rapporteurs de cette thèse. Merci beaucoup et encore désolé pour le timing assez serré.

Je remercie toutes les personnes qui ont accepté de faire partie du jury. Je remercie Pierre Bongrand pour son accueil dans son laboratoire et pour toutes nos discussions. Je remercie Franz Bruckert de m'avoir toujours super bien accueillie au CEA dans son laboratoire. Je remercie Gladys Massiera pour sa bonne humeur, sa sympathie et pour tous ses conseils.

Je remercie Annie Viallat, ma directrice de thèse, pour m'avoir coaché pendant ces 4 années, pour son hospitalité et pour m'avoir fait découvrir un nouvel environnement scientifique.

Je remercie tous les chercheurs, thésards et stagiaires que j'ai pu rencontrer au Laboratoire de Spectrométrie Physique à Grenoble. Merci particulièrement à Antoine Delon et Jacques Derouard pour nos expériences et discussions sur la FCS. Merci à Thierry Biben pour toutes nos discussions et sa sympathie. Merci à Daniel Riveline pour m'avoir donné envie de faire de la biophysique. Merci à l'homme bulle : François Graner et à son formidable ancien thésard Benjamin. Merci Benjamin pour nos parties de foot, nos rigolades, et courage. Merci à Julien et à Hélène. Un grand merci à mon binôme de toujours Maud. Courage ! Merci à Pauline pour m'avoir supporté moi et ma musique alors qu'on partageait le même bureau. Un immense merci à mon pote Yogenovitch (Yoann) pour tous ces super moments passés au labo, pour nos déconnades, pour ce formidable voyage à Paris pour aller voir Rammstein qui sera inoubliable. Enfin je remercie Philippe, pour son amitié, pour toutes nos discussions que ce soit sur l'informatique, les jeux, les bouquins de SF ou d'héroïc fantasy. Merci Philippe et comme dirait l'autre : "C'est pas faux". Merci à Magalie, pour tous ses excès de voix, et pour tous nos moments de rigolade. Enfin, je remercie Jean-Marie et Manu pour m'avoir accompagné pendant quelques mois dans le monde de la recherche.

Merci à toutes les personnes composant la formidable équipe U600 à Marseille. Merci à Anne-Marie et Anne, pour leur sympathie, leur gentillesse et pour les Ferrero. Merci à PHP pour ses superbes croquis, ses précieux conseils, sa bonne humeur et ses phrases "assassines". Merci à Philippe notre docteur² (et oui docteur en médecine et en immunologie) pour son hospitalité, pour sa gentillesse et toutes ces formidables pauses à 4h. Merci à notre Viking du Sud : Laurent pour tous ses conseils, pour tous ce qu'il m'a appris sur Igor, sur le RICM, merci pour sa grande disponibilité. Je remercie Zohar, l'homme détesté par Zeiss à cause des remises qu'il obtient. Merci à Théo et Marie-Pierre pour leur très grande générosité, gentillesse et hospitalité. Bises à vos filles. Merci à Zen et Clément les derniers thésards. Merci à Clément pour m'avoir fait découvrir tout un nouveau pan du vocabulaire français : "Super Michel". Un grand merci à Sylvain pour toutes ses déconnades, pour sa bonne humeur, et sa grande sympathie. Merci et bonne chance en Belgique, une fois.

Je remercie les gens du CEA : merci à Roberto Kalemzuck et à Thierry Livache de leur accueil et de m'avoir rapidement initié à la SPR. Un merci particulier à Manu pour toutes les expériences qui ont été toujours effectuées dans une incroyable bonne humeur.

Je remercie Nico pour tous nos délires, pour être resté avec moi pendant deux heures pour rien à regarder une cellule essayant de s'étaler, pour avoir initié l'idée d'aller voir Rammstein et pour avoir pris sa tuteur pour nous y emmener. Merci pour tes fondues, et ton sublime pain. Je remercie aussi So et tes parents, qui nous ont si merveilleusement accueilli Esther et moi lors de notre voyage en Corse.

A présent je remercie tous les gens des l'assoce Excalibur-Dauphiné pour les franches parties de rigolades, de déconnes, de fight, de basket, de grandeur nature, pour toutes ces chouettes animations que nous avons mené au bout. Merci à Fred Prez, à Schlopsy, au soeurs Chevalier pour leur art de la cuisine et les formidables chants, à Meiga et Leynah, à Ludork pour ses séances d'entraînement musclées et pour son merveilleux hypocras, à DamB pour ses relectures de ma thèse, et pour sa sympathie, à Flo qui est parti bien loin et à Seishiro.

Je remercie en particulier quelques personnes d'Excalibur-Dauphiné sans qui la vie serait bien morose : merci à JB, le bouffon, l'homme caoutchouc d'Exca, pour être JB, pour nos parties de basket. Merci à Tof le fourbe pour toutes ses ralleries (non pas taper, copain !), les délires, les complots et rires au Malaterre, sa partie de Vampire, sa sympathie, son amitié, les rigolades lors des parties de jeux de plateau et les échanges de coups d'épées. Merci à Kalilith pour sa bonne humeur, son amitié, sa grande générosité, ses cheveux rouges, les rigolades et les échanges de coups d'épées. Un gigantesque merci à Chichille, l'homme testant perpétuellement la Loi de Murphy. Merci Achille pour ton hospitalité si généreuse, merci pour m'avoir si souvent supporté chez toi, merci pour m'avoir fait découvrir les joies du rebouchage de baignoire, merci pour toutes ces parties de Rêve de Dragon et de jeux de plateau et tous ces visionnages de films. Attention aux Shogoths Ach !. Merci à Ghor Bey, pour toutes nos parties de LAN, nos déconnes, nos soirées de JDR et de jeu de plateau, pour m'avoir finalement suivi à Exca, pour tous nos fights et j'espère pour nos futurs concerts. Merci à Yasin, notre Stardux à nous, pour sa science des jeux de plateau, nos fights jusqu'à 4h du matin à AVP, nos délires qui m'ont notamment amené à faire jouer un drôle de personnage à Rêve de Dragon et pour son amitié. Merci à vous tous d'être rentré dans ma vie et d'en faire partie.

Mes remerciements les plus sincères et les plus profonds vont à toute ma famille et en particulier à mes parents sans qui rien n'aurait été possible, et à ma petite soeur.

Enfin, je remercie Esther pour tout et le reste.

Table des matières

1	Introduction	11
2	État de l'art	15
2.1	Interactions non spécifiques	16
2.1.1	Interaction de type Van der Waals	17
2.1.2	Interaction de solvation	18
2.1.3	Interaction électrostatique	19
2.1.4	Interaction stérique	20
2.2	L'adhésion spécifique	22
2.2.1	Cinétique d'une réaction ligand-récepteur	22
2.2.2	Comment mesurer la constante de dissociation d'une liaison ?	23
2.2.3	Quelques techniques de mesures de temps de vie	25
2.3	Dynamique sous écoulement près d'une paroi d'objets micrométriques sans interaction	28
2.3.1	Billes rigides dans un écoulement de cisaillement : approche de Goldman	28
2.3.2	Mouvements d'objets non sphériques à membrane fluide près d'une paroi	31
2.4	Les effets de l'adhésion sur le mouvement d'objets : modèles/simulations	34
2.4.1	Force s'exerçant sur une bille accrochée à une surface via un lien unique dans un écoulement de cisaillement	34
2.4.2	Modèles de pelage	34
2.4.3	Modélisation par Hammer	37
2.4.4	Modèle de cinétique de détachement	39
2.5	Observations des effets de l'adhésion sur le mouvement d'objets	40
2.5.1	Quelques études d'objets micrométriques en adhésion soumis à un cisaillement.	40
2.6	Conclusions	42
3	Choix du système expérimental	43
3.1	La chélation : une interaction spécifique	44
3.1.1	Constante de stabilité	44

3.1.2	L'interaction nickel-histidine	45
3.1.3	Justification du choix de l'interaction	46
3.1.4	Spectroscopie de force de l'interaction Nickel-Histidine par AFM	47
3.2	A propos des vésicules	48
3.2.1	Propriétés des vésicules : la fluidité de la membrane.	50
3.2.2	Propriétés des vésicules : perméabilité et taux de dégonflement.	51
3.2.3	Propriétés mécaniques des vésicules : énergie de courbure	52
3.2.4	Propriétés mécaniques des vésicules : extension-compression (" <i>stretching</i> ")	52
3.2.5	Propriétés mécaniques des vésicules : fluctuation de la membrane	52
4	Elaboration du système expérimental	53
4.1	Lipides employés et fabrication des vésicules-nickel.	54
4.2	Les billes d'agarose chélatantes	55
4.3	Réalisation des surfaces	57
4.3.1	Les peptides utilisés	57
4.3.2	Les différents protocoles de greffage	57
5	Caractérisation des surfaces et des objets	61
5.1	Caractérisation des surfaces par Spectroscopie à corrélation de fluorescence (FCS)	62
5.1.1	Principe général de la FCS	62
5.1.2	Calcul du nombre moyen de molécules grâce à la fonction d'auto-corrélation	63
5.1.3	Calcul du nombre de molécules présentes sur la surface d'un échantillon par analyse statistique des fluctuations de fluorescence.	64
5.1.4	Dispositif expérimental et surfaces utilisées.	64
5.1.5	Résultats	68
5.2	Caractérisation des surfaces par microscopie confocale	72
5.3	Caractérisation par fluorescence des vésicules et les billes d'agarose	73
5.4	Conclusion	73
6	Méthodes d'observation et mise en place de l'écoulement de cisaillement.	75
6.1	Les différentes techniques de microscopie utilisées	76
6.1.1	Le microscope à contraste de phase	76
6.1.2	La microscopie à contraste interférentiel en réflexion : RICM	77
6.2	Les chambres d'écoulement	78
6.2.1	Chambre de flux classique	78
6.2.2	Chambre de flux en vue de côté et le microscope couché	79
6.3	Application d'un flux.	80
6.4	Acquisition des images et numérisation	81
7	Programmes de traitement d'images et de suivi automatique d'objets en déplacement.	83
7.1	Détermination du contour d'un objet	84

7.1.1	Le filtre <i>bpass</i>	84
7.1.2	Programme pour déterminer le contour d'un objet	85
7.2	Suivi automatique de billes d'agarose observées en microscopie classique.	86
7.3	Suivi automatique de billes d'agarose vues en RICM	88
7.3.1	Suivi de l'aire de la zone de contact	88
7.3.2	Suivi du centre de gravité de la bille à l'aide des franges d'interférences.	91
8	Vésicules en adhésion forte dans un écoulement de cisaillement	93
8.1	Conditions expérimentales	94
8.2	Détermination de la forme des vésicules	94
8.3	Observation de l'écoulement de surface	96
8.4	Détermination des lignes de courant de surface	97
8.5	Vitesses angulaires	99
8.6	Discussion	100
9	Vésicules et billes en adhésion faible sous écoulement	105
9.1	Adhésion faible de vésicules : mouvements sans adhésion et en présence d'adhésion	106
9.1.1	Conditions expérimentales	106
9.1.2	Observations	107
9.1.3	Cas des vésicules à vitesse constante	107
9.1.4	Cas des vésicules présentant de la saltation	110
9.1.5	Cas des vésicules dont le déplacement s'effectue à des vitesses non-constantes	112
9.1.6	Cas des vésicules déformées	115
9.1.7	Capture forte d'une vésicule	115
9.1.8	Conclusion	115
9.2	Adhésion contrôlée de billes d'agarose : détachement	117
9.2.1	Conditions expérimentales	117
9.2.2	Observations	118
9.2.3	Méthodes d'analyse	118
9.2.4	Résultats	119
9.2.5	Interprétation	120
9.2.6	Conclusion	123
9.3	Adhésion contrôlée de billes : dynamique sous écoulement vue par RICM	125
9.3.1	Méthodes d'observations et conditions expérimentales	125
9.3.2	Observations et analyses	125
9.3.3	Résultats	128
9.3.4	Conclusion	137
9.4	Adhésion contrôlée de billes : dynamique en adhésion des billes observées en transmission	138
9.4.1	Conditions expérimentales	138
9.4.2	Observations	138
9.4.3	Méthode d'analyse	139
9.4.4	Distribution des vitesses	141

9.4.5 Régimes de non-adhésion	143
9.4.6 Régimes d'adhésion	144
9.4.7 Conclusion	147
9.5 Annexe : Méthode d'analyse de vitesses	148
10 Conclusions et Perspectives	149
Bibliographie	151
Liste des figures	157
Liste des tableaux	164
A Protocole de purification d'histidine-GFP	167
B Protocole de fonctionnalisation de AV20KH avec du FITC	169

Introduction

Dans le domaine de la physico-chimie, le terme d'adhésion sous entend de nombreuses forces attractives, de type forces de Van Der Waals ou encore électrostatique, ce type d'adhésion étant considéré comme non-spécifique. Par contre, en biologie, le terme adhésion désigne directement des interactions spécifiques de type clé/serrures. Ces interactions mettent en pratique une reconnaissance stéréo-spécifique entre deux molécules (une complémentarité chimique et topologique des molécules). On peut par exemple citer des interactions de type cadhérines/cadhérines intervenant dans l'adhésion cellule/cellule ou encore ICAM1/LFA1 permettant l'adhésion leucocytaire. Un tel éventail de molécules d'adhésion est nécessaire afin d'obtenir des phénomènes réversibles et hautement sélectifs. L'adhésion cellulaire est un processus biologique qui participe à de nombreuses étapes de la vie cellulaire (survie, prolifération, migration, ...). Certaines activités pathologiques tels que la formation de métastases tumorales ou la réponse inflammatoire en sont des exemples fascinants. Ce dernier cas met en jeu le recrutement des leucocytes dans l'écoulement sanguin, circulant puis s'attachant aux parois vasculaires (figure 1.1).

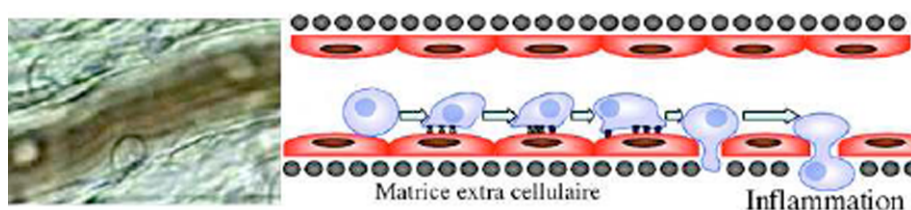


FIG. 1.1 – A gauche image d'un leucocyte en adhésion sur la paroi endothéliale. Le flux déforme le leucocyte. A droite représentation schématique des différentes étapes de la réponse inflammatoire : le leucocyte adhère aux parois activées par la présence de l'inflammation. Le leucocyte roule sur la paroi et est freiné. Enfin, il est accroché fermement et migre vers le lieu de l'inflammation.

En effet lors de la réponse inflammatoire, des cascades de processus biochimiques permettent l'expression de protéines d'adhésion spécifique à la surface des capillaires sanguins. Des globules blancs circulant dans le flux sanguin sont alors ralentis avant de s'attacher fer-

mement sur la surface pour finalement migrer vers le lieu de l'inflammation. Toute cette activité se déroule en présence d'un fort taux de cisaillement (quelques centaines de s^{-1}). La compréhension de ce processus immunitaire nécessite à la fois de connaître les mécanismes biologiques impliqués mais aussi les phénomènes physiques permettant de décrire le mouvement de ces objets en adhésion sollicités par un écoulement de cisaillement. Par exemple, une observation attentive du mouvement des leucocytes indique que leur déplacement en adhésion sous flux n'est pas régulier mais s'effectue à vitesse non constante. Quel est l'origine de ce phénomène ? Quel est l'effet de la contrainte hydrodynamique, de la densité de sites d'adhésion sur ce phénomène ? Quel rôle joue la déformabilité de ces objets sur leur dynamique sous écoulement ?

Nombre de questions impliquant des processus de nature physique restent ouvertes aujourd'hui. L'objectif de ce mémoire est d'aborder certaines de ces questions sur des systèmes contrôlés. En effet, au vu de la diversité et de la complexité des systèmes biologiques, nos efforts se sont focalisés sur la mise au point de systèmes expérimentaux modèles permettant d'isoler certaines caractéristiques et certains paramètres impliqués dans le processus d'adhésion : la densité des molécules d'adhésion, les valeurs des contraintes hydrodynamiques. On souhaite décrire et comprendre les mouvements possibles pour un objet sous écoulement en adhésion, quand celui-ci est déformable, quand on change la densité des molécules d'adhésion et quand on fait varier les contraintes hydrodynamique. Quel rôle joue la fluidité de la membrane sur la motilité de l'objet en adhésion ? Nous avons développé deux systèmes : *des vésicules géantes lipidiques* qui sont des objets déformables de 10 à 40 microns de rayon, constitués d'une bicouche, à membrane fluide, dans laquelle peuvent être insérées des molécules d'intérêt comme des protéines pouvant mimer des interactions spécifiques. De plus de part la fluidité de la membrane, les molécules peuvent venir se regrouper pour renforcer l'adhésion ; et *des billes rigides*, localement légèrement déformables, de 10 à 60 microns de rayon, sans possibilité pour les liaisons de se regrouper. Le système d'interaction choisi a été la reconnaissance spécifique entre des histidines et du nickel : la chélation. Cette interaction de chélation présente l'avantage d'être facilement réalisable à l'aide de lipides greffés avec du nickel, et surtout d'être modulable. En effet, la force de l'interaction est modulable par l'imidazole, la partie complexante de l'histidine. Ainsi, en utilisant un couple unique récepteur/ligand, il devient possible d'étudier les mouvements de ces objets en interaction avec une surface et soumis à un écoulement.

Dans un premier temps le chapitre 2 est consacré à un état de l'art sur l'adhésion, sur le mouvement d'objets micrométriques adhérant ou non près d'une paroi. Le chapitre 3 est consacré à la présentation du système d'adhésion retenu dans ce travail : la chélation. Le chapitre 4 présente l'élaboration des objets et des surfaces utilisées avant de s'attaquer dans le chapitre 5 à la description des différentes techniques permettant de caractériser les surfaces et les objets et aux résultats obtenus. Le chapitre 6 détaille les techniques de microscopie utilisées lors des expériences d'adhésion puis le chapitre 7 est consacré à la reconnaissance de forme d'objets rigides ou déformables et le suivi automatique des objets. Le chapitre 8 porte sur l'étude en adhésion forte de vésicules soumises à un écoulement de cisaillement. Le chapitre 9 porte sur l'étude en adhésion faible de vésicules et de billes rigides d'agarose soumises à un écoulement de cisaillement. Enfin, nous montrerons les voies possibles de poursuite de ce travail sur des systèmes modèles de membrane cellulaire, et que peut on encore rajouter

pour se rapprocher un peu plus de la réalité biologique.

Chapitre 2

État de l'art

L'adhésion joue un rôle majeur et détermine certains des aspects fondamentaux du comportement cellulaire (prolifération, différenciation, survie, migration) et biomédicaux (une infection commence par l'adhésion d'une bactérie ou d'un virus). Cette adhésion cellulaire fut d'abord expliquée par la théorie DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek), prenant naissance dans le domaine des particules colloïdales. On essaya alors d'expliquer l'adhésion cellulaire en terme d'équilibre entre des interactions répulsives (électrostatique par exemple) et attractives (forces de van der Waals par exemple). Or il fut démontré que ces phénomènes d'adhésion étaient essentiellement déterminés par des interactions spécifiques entre des molécules d'adhésion.

On parle d'adhésion spécifique quand un type de molécule reconnaît spécifiquement un autre type de molécule (on parle alors de couple ligand-récepteur). Ce type d'interaction est différent des interactions non spécifiques présentées dans le paragraphe 2.1 car elles dépendent de la reconnaissance au niveau moléculaire du ligand et du récepteur (on peut parler alors de stéréo-spécificité). Dès lors, on peut s'intéresser à l'étude et à la détermination des propriétés intrinsèques d'un couple de molécules comme sa durée de vie ou encore son taux de dissociation (paragraphe 2.2). Mais il faut garder à l'esprit que l'adhésion dépend de beaucoup de paramètres comme on peut le voir sur la figure 2.1.

Ainsi, outre les propriétés intrinsèques d'une liaison ligand-récepteur (la durée de vie, le paysage énergétique), la taille, la flexibilité et la mobilité de ces molécules vont influencer le comportement adhésif d'une cellule sur une surface ou sur une autre cellule. De plus, ces interactions sont soumises et sollicitées par différentes forces extérieures comme des interactions non spécifiques et comme un flux de cisaillement.

Dans ce chapitre, nous allons nous intéresser aux différentes forces non spécifiques pouvant influencer l'adhésion, pour ensuite expliciter ce que l'on nomme "adhésion spécifique " entre un ligand et un récepteur. Nous verrons entre autres les différentes techniques permettant de sonder les propriétés intrinsèques d'une interaction spécifique. Nous parlerons ensuite de la dynamique d'objets micrométriques soumis à un flux de cisaillement près d'une paroi et sans interaction, avant de rajouter les effets dus à l'adhésion et cela d'un point de vue théorique et expérimental.

2.1 Interactions non spécifiques

Diverses interactions peuvent entrer en compétition avec l'adhésion spécifique entre cellules ou entre une cellule et un substrat. Ces interactions d'origines différentes peuvent être attractives ou répulsives et vont jouer un rôle important dans ce que l'on appelle la primo-adhérence : la formation du premier lien qui pourra ou se briser ou favoriser la formation d'un nouveau lien.

Quatre types d'interactions répulsives ou attractives vont être décrits ici et classés par portée croissante :

- les interactions de Van der Waals
- les interactions de solvation
- les interactions électrostatiques
- les interactions stériques

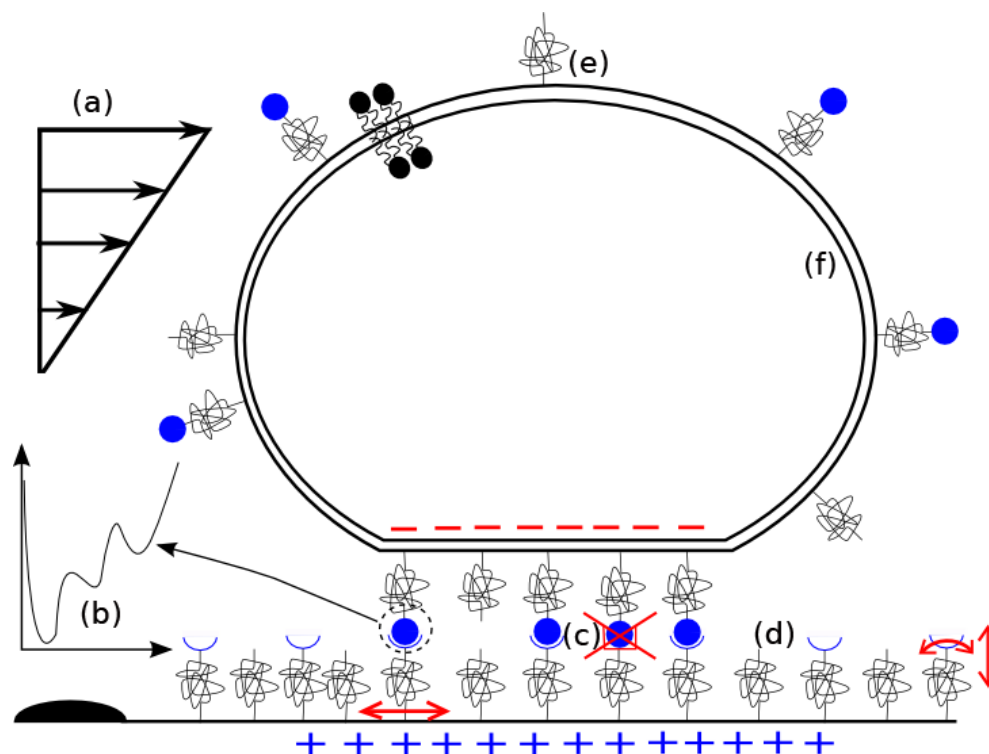


FIG. 2.1 – Schéma présentant différents paramètres jouant un rôle dans l'adhésion cellule-cellule ou cellule-substrat. Nous avons listé quelques paramètres : (a) : la force extérieure, ici un cisaillement, (b) : le paysage énergétique de la liaison, (c) : la spécificité de l'interaction, (d) : l'accessibilité des ligands et des récepteurs et la diminution des interactions non spécifiques par l'ajout d'espaceurs sur la surface ou sur la cellule (e) ou encore la rugosité de la surface ou la composition de la membrane lipidique (f).

2.1.1 Interaction de type Van der Waals

Les forces de Van der Waals sont attractives et apparaissent quel que soit l'état de charge des membranes. Elles ont pour origine des interactions de types moléculaire et dipolaire.

Toutes les molécules possèdent un moment dipolaire qui peut être un moment dipolaire instantané ou dans le cas de molécules polaires, la superposition d'un moment dipolaire instantané et d'un moment dipolaire permanent. Le moment dipolaire instantané a pour origine la fluctuation quantique des nuages d'électrons autour des noyaux. De plus, toutes les molécules sont polarisables : l'application d'un champ électrique déplace les nuages d'électrons et les noyaux dans des sens opposés, créant ainsi un moment dipolaire induit. Considérons deux molécules 1 et 2 distantes de r . La molécule 1 possède le moment dipolaire P_1 qui crée sur 2 un champ induit E_1 . Le champ E_1 déplace les électrons de 2 et crée un moment dipolaire P_2 sur 2. P_2 interagit avec P_1 de façon attractive.

Il existe 3 types d'interactions de Van der Waals, toutes attractives en $1/r^6$:

- L'interaction de type dipôle instantané-dipôle instantané (interaction dispersive ou interaction de London).
- L'interaction de type dipôle permanent-dipôle induit (interaction d'induction ou interaction de Debye). Elle apparaît lorsqu'une des deux molécules est polaire.
- L'interaction de type dipôle permanent-dipôle permanent (interaction d'orientation ou interaction de Keesom). Elle apparaît lorsque les deux molécules sont polaires.

L'ensemble de ces interactions sont regroupées sous le terme d'interactions de Van der Waals. Cette force est sensible pour des distances inférieures à 5 nm car elle suppose que les moments dipolaires instantanés des deux molécules restent constants pendant la durée nécessaire au champ électrique pour se propager d'une molécule à l'autre. Pour des distances plus grandes, l'interaction de Van der Waals est plus faible et son intensité s'exprime en $1/r^7$. Pour deux surfaces macroscopiques, l'interaction de Van der Waals peut être déduite des interactions de Van der Waals microscopiques entre les molécules les composant. En supposant qu'elles sont additives, on peut additionner toutes les interactions existantes entre les molécules de la première surface et les molécules de la seconde surface. Le résultat dépend des géométries des deux surfaces ([Hamaker, 1937], [Israelachvili, 1992]). Ainsi, si l'on considère une sphère de rayon R (nous choisissons ici le cas d'une sphère car les cellules ou les bicouches peuvent être approximées par une sphère), de densité ρ_1 , distante d'une distance D d'un plan de densité moléculaire ρ_2 et dont les molécules interagissent, on peut définir une interaction macroscopique [Israelachvili, 1992] :

$$E_{vdw} = \frac{AR}{6D}, \quad (2.1)$$

où A est la constante d'Hamaker : $A \propto \rho_1 \cdot \rho_2$ et dépend aussi de la polarisabilité des espèces présentes (l'eau et les lipides pour une bicouche lipidique par exemple). Ainsi, pour une bicouche lipidique se trouvant au voisinage d'un substrat, les forces de Van der Waals seront négligeables pour des distances de séparations de la taille des bicouches. Par contre, pour des distances de quelques nanomètres, les forces de Van der Waals pourront atteindre plusieurs centaines de $k_B T$ ¹.

2.1.2 Interaction de solvation

Les molécules d'eau ne sont pas organisées de la même façon lorsqu'elles sont en solution ou à proximité d'une surface amphiphile.

La forte affinité entre les têtes polaires d'une surface et les molécules d'eau force ces dernières à s'organiser en couches discrètes sur une distance de quelques diamètres moléculaires. C'est la zone d'hydratation. Lorsque deux surfaces se rapprochent l'une de l'autre, les zones d'hydratation se recouvrent et il apparaît une force répulsive à courte portée. En présence de surfaces hydrophiles, les molécules d'eau s'organisent en couches très denses et ont tendance à se lier fortement aux surfaces. Si l'on rapproche ces deux surfaces, il est donc nécessaire d'apporter une très forte énergie pour détruire ces couches. Il en résulte une force très répulsive. La portée de cette répulsion entre deux surfaces hydrophiles est de l'ordre de 4 nm

¹ k_B est la constante de Boltzmann et T la température. Le produit des deux est une énergie caractéristique des mouvements moléculaires

[Tareste, 2002].

Sur des surfaces hydrophobes, l'affinité de l'eau pour ces surfaces étant moins grande que l'affinité de l'eau pour l'eau, les molécules d'eau auront tendance à fuir l'espace entre les deux surfaces. Leur densité sera alors plus faible entre les deux surfaces qu'en volume et cela se traduira par une force attractive de type déplétion. C'est l'interaction hydrophobe. La portée et l'intensité de l'attraction entre deux surfaces hydrophobes sont importantes. Sa portée est de l'ordre de quelques dizaines de nanomètres et son intensité est supérieure aux forces de Van der Waals. [Tareste, 2002]

2.1.3 Interaction électrostatique

Une surface membranaire, qu'elle soit simple (ex : vésicules lipidiques de synthèse) ou que ce soit la membrane d'une cellule, est chargée par l'ionisation des têtes hydrophiles ou par adsorption des ions présents dans la solution : 2.2.

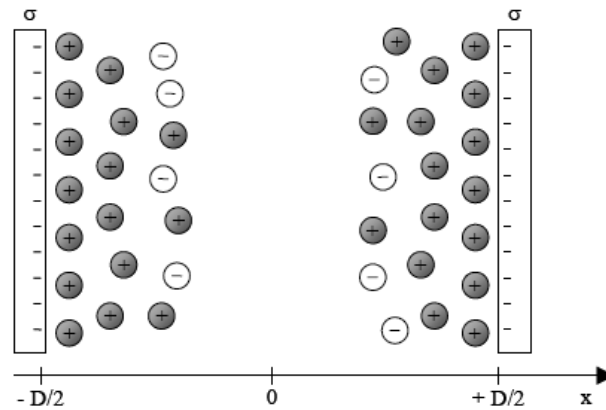


FIG. 2.2 – Représentation schématique de deux surfaces chargées négativement de densité surfacique de charge σ plongées dans une solution d'électrolyte, adapté de [Tareste, 2002]. L'axe des x correspond à la distance séparant les deux surfaces.

Lorsqu'on rapproche deux surfaces de bicouches chargées, de même charge, il apparaît alors entre elles une répulsion de nature électrostatique dont la portée dépend de la concentration des ions en solution. Les ions de charge opposée à celle des surfaces (les contre-ions) ont tendance à se rapprocher des surfaces alors que les ions de même charge ont tendance à s'en éloigner. La couche de contre-ions qui se développe au voisinage des surfaces écran les charges de la surface et, à partir d'une certaine distance (de l'ordre de quelques longueurs de Debye, λ_D) les surfaces peuvent être assimilées à des surfaces neutres. En effet, l'énergie d'interaction électrostatique, E_{elec} , entre deux surfaces chargées séparées d'une distance D décroît exponentiellement avec la distance, sur une distance caractéristique qui est λ_D , la longueur de Debye ([Israelachvili, 1992]) :

$$E_{\text{elec}}(D) \propto e^{-D/\lambda_D} \quad (2.2)$$

Nature de l'électrolyte	a
1 : 1	0.304
2 : 1	0.176
2 : 2	0.152

TAB. 2.1 – Valeur de a pour différents électrolytes

La longueur de Debye est décrite par la formule suivante :

$$\lambda_D = \sqrt{\frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r k_B T}{\sum_i z_i^2 e^2 \rho_i(\infty)}} \quad (2.3)$$

où ε_0 et ε_r sont respectivement la permittivité du vide ($=8.854 \cdot 10^{-12} \text{ C}^2 \text{ J}^{-1} \text{ m}^{-1}$) et la permittivité de la solution d'électrolyte et où z_i et $\rho_i(\infty)$ sont respectivement la valence des ions i et leur concentration en volume (loin des surfaces).

Suivant la nature de l'électrolyte et sa concentration c (en mol/L) nous pouvons estimer la longueur de Debye en nm ([Israelachvili, 1992]) correspondante : $\lambda_D = \frac{a}{\sqrt{c}}$ avec c la concentration et a un facteur dépendant de la nature de l'électrolyte et présenté dans le tableau 2.1.

On voit que si la force ionique augmente, la longueur de Debye diminue. Cela signifie que pour voir apparaître un effet de répulsion ou d'attraction électrostatique entre deux surfaces dans un milieu très concentré en électrolytes (les charges de surface sont donc très écrantées), il faut que les surfaces soient plus proches que dans le cas où le milieu est déplété en électrolytes. Ainsi, dans un tampon de culture, souvent concentré en sels (ex : Dulbecco's (dont la concentration est supérieure à 0.5 mol/L de sels)), la longueur de Debye est inférieure à 1 nm. Si on rapproche les deux surfaces de même charge, une force répulsive apparaît dès que les couches de contre-ions commencent à se recouvrir. Lorsque les surfaces sont de charges opposées, les couches de contre-ions auront tendance à se recouvrir et le contact entre les surfaces sera étroit.

2.1.4 Interaction stérique

Les interactions stériques sont la plupart du temps répulsives. Elles sont de nature entropique et ont plusieurs origines.

D'une part, les bicouches lipidiques sont des surfaces molles qui se déforment sous l'effet de l'agitation thermique car leur tension est faible. Ces fluctuations de la membrane peut atteindre des amplitudes de mouvement de l'ordre du μm . Lorsqu'une bicouche se rapproche d'une surface, les oscillations de la bicouche voient leurs amplitudes diminuer à cause de la présence d'un mur. L'entropie de la membrane est alors diminuée, ce qui crée une répulsion d'origine entropique afin que la bicouche puisse fluctuer plus librement. Cette répulsion entropique fut introduite par Helfrich [Helfrich, 1973] et on la nomme couramment "interaction d'Helfrich". Ce potentiel d'interaction dépend de la distance d entre la bicouche et la surface et est de la forme $V_{\text{Helfrich}} \propto \frac{(kT)^2}{\kappa d^2}$ avec κ le module de

courbure. Une bicouche sous tension σ aura des amplitudes de fluctuations beaucoup plus faibles. En prenant en compte la tension dans la théorie d'Helfrich, le potentiel s'écrit alors :

$$V_{\text{Helfrich}} \propto \frac{kT\sigma}{\chi} \exp\left(-\frac{d}{\sqrt{2\pi\sigma/kT}}\right) \left(\frac{\sqrt{kT/2\pi\sigma}}{d}\right)^{1/4}.$$

Ces fluctuations peuvent favoriser l'adhésion en permettant à la bicouche de sonder une région de l'espace plus importante et donc augmenter la probabilité de rencontre d'un ligand avec son récepteur mais elles défavorise l'adhésion en créant une force répulsive.

De plus, lorsqu'on rapproche deux surfaces dont au moins une est couverte de polymères, il apparaît généralement une force répulsive d'origine entropique. Ce phénomène de répulsion stérique se retrouve chez les cellules. En effet, à la surface des cellules, se trouve le glycocalyx, véritable forêt de glycosaccharides, présent sur la membrane plasmique. Il a pour rôle de protéger les cellules des forces de type Van der Waals afin de favoriser les interactions spécifiques.

A partir de toutes ces forces mises en jeu, Rädler et coll. [Rädler et al., 1995] se sont intéressés à tracer le potentiel d'interaction d'une bicouche lipidique en fonction de la distance d'équilibre entre la bicouche et une surface, la bicouche étant soumise à des interactions de Van der Waals, gravitationnelles (son propre poids) et stériques (répulsions dues aux ondulacions des membranes). Le potentiel total d'interaction est présenté sur la figure 2.3 en considérant une constante de Hamaker de $2.6 \times 10^{-21} \text{ J/m}^2$, une tension $\sigma = 1.7 \times 10^{-5} \text{ J/m}^2$ et un module de courbure $\chi = 35 \text{ kT}$. On remarque que ce potentiel présente un minimum

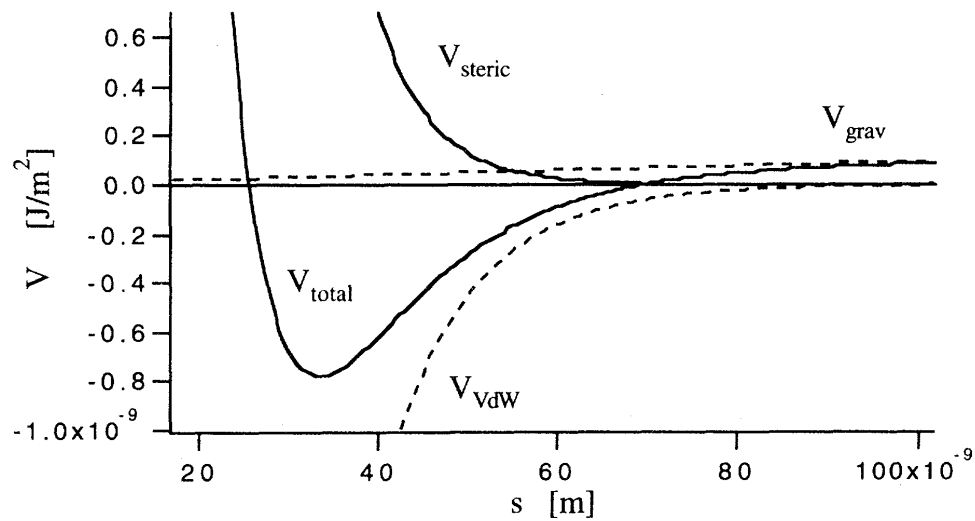


FIG. 2.3 – Potentiel d'interaction d'une bicouche lipidique proche d'une surface en fonction de la distance d'équilibre de la bicouche à la surface en superposant les interactions de Van der Waals (lignes en pointillés), stériques (lignes pleines) et gravitationnelles (lignes en tireté-pointillés). Cette superposition présente un minimum vers 35 nm, d'après [Rädler et al., 1995].

pour une distance d'équilibre de l'ordre de 35 nm. Ce potentiel changera dramatiquement si à ces interactions, l'on rajoute des interactions attractives spécifiques.

2.2 L'adhésion spécifique

L'adhésion spécifique met en jeu des molécules (ligands) reconnaissant de façon spécifique (au niveau moléculaire) d'autres molécules (les récepteurs). Cette association peut se faire via plusieurs interactions (liaisons hydrogène, liaison hydrophobe).

2.2.1 Cinétique d'une réaction ligand-récepteur

Pendant longtemps, les interactions ligand-récepteur furent caractérisées principalement par leur cinétique d'association (en évaluant les constantes thermodynamiques cinétiques d'association, de dissociation) et par leur affinité (la force reliant le ligand au récepteur). On définit la réaction d'un ligand L avec un récepteur R pour donner un complexe C par l'équilibre suivant ([Bell, 1978], [Bongrand, 1999]) :



où k_{on} et k_{off} sont respectivement la constante cinétique d'association (exprimée en $\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$) et la constante cinétique de dissociation (exprimée en s^{-1}), reliées à la vitesse de la réaction v par la relation suivante :

$$v = \frac{d[C]}{dt} = k_{\text{on}}[L][R] - k_{\text{off}}[C] \quad (2.5)$$

Les crochets font référence aux concentrations des espèces, concentrations exprimées en mol/L. A l'équilibre, v vaut 0 et on peut alors écrire :

$$\frac{[R]_{eq}[L]_{eq}}{[C]_{eq}} = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}} = K_D = \frac{1}{K_A} \quad (2.6)$$

où K_D est la constante thermodynamique de dissociation (en mol/L) et K_A est la constante thermodynamique d'association (en $\text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$) plus communément appelée affinité.

Les constantes cinétiques permettent de décrire la vitesse de formation des liaisons et leur durée de vie, alors que l'affinité décrit la probabilité de former le complexe C.

Afin de réagir ensemble, les deux entités L et R doivent d'abord se rencontrer (transport physique ou diffusion) pour former un complexe de rencontre L-R avant de réagir (réaction) et de former C. Pour rendre compte de ce processus, nous devons modifier l'équation 2.4 :



où d_+ et d_- sont les constantes cinétiques de l'étape de diffusion et r_+ et r_- , les constantes cinétiques de l'étape de réaction. En supposant que le complexe $L - R$ se trouve dans un état quasi-stationnaire (pas de variation de sa concentration), on peut alors reformuler les constantes cinétiques d'association et de dissociation sous la forme :

$$k_{\text{on}} = \frac{d_+ r_+}{d_- + r_+} \quad (2.8)$$

$$k_{\text{off}} = \frac{d_- r_-}{d_- + r_+} \quad (2.9)$$

et donc définir une nouvelle constante thermodynamique d'association K_A :

$$K_A = \frac{1}{K_D} = \frac{k_{\text{on}}}{k_{\text{off}}} = \frac{r_+ d_+}{r_- d_-} \quad (2.10)$$

Les constantes cinétiques de l'étape de diffusion ne dépendent que des constantes de diffusion de L et de R et de la distance les séparant $x_{L,R}$.

Tout cela est valable pour les couples L et R présents en solution ou attachés sur une membrane (d'une cellule par exemple).

2.2.2 Comment mesurer la constante de dissociation d'une liaison ?

De nombreuses techniques ont été mises au point afin de déterminer les constantes cinétiques de dissociation de plusieurs couples ligand - récepteur. Afin de sonder les propriétés moléculaires du couple L-R, nous avons besoin d'appliquer une force extérieure F pour casser la liaison et mesurer une durée de vie (inverse du taux de dissociation à force F nulle). Or, il a été suggéré par un travail théorique mené par Bell [Bell, 1978] en s'appuyant sur le fait qu'en appliquant une force constante F sur le couple L-R, le potentiel d'interaction est alors abaissé d'une valeur égale à $F \cdot d$, où d est une coordonnée spatiale faisant référence à la portée des interactions moléculaires que l'on nommera "paramètre de force". Le taux de dissociation k_{off} s'écrit alors :

$$k_{\text{off}}(F) = k_{\text{off}}(0) \cdot e^{\frac{F \cdot d}{k_B \cdot T}} \quad (2.11)$$

où T est la température, k_B est la constante de Boltzmann et $k_{\text{off}}(0)$ le taux de dissociation de l'état lié LR en l'absence de force extérieure. Pour la suite, nous ferons référence à l'équation 2.11 sous le nom de Loi de Bell. Si l'on considère une interaction antigène-anticorps, alors $d = 0.5$ nm et la force critique correspondant au paramètre de force $f_\beta = k_B \cdot T / d$ sera de l'ordre de 8 pN à 25 °C [Bell, 1978]. Ainsi, en mesurant la constante de dissociation pour différentes forces appliquées, nous pouvons tracer le logarithme de la constante de dissociation en fonction de la force. La pente nous renseigne sur le paramètre de force alors que l'ordonnée à l'origine nous donne le temps de vie à force nulle.

Outre l'application de forces constantes, nous pouvons appliquer une rampe de forces et déterminer la force pour laquelle la liaison rompt. Pour cela, deux surfaces solides sont séparées l'une de l'autre avec une vitesse v constante. La force appliquée nécessaire au détachement des surfaces, est mesurée par la déformation d'un capteur de force de raideur K . On définit alors le taux de charge r qui est le produit de la vitesse d'application de la

force et de la raideur : $r = v.K$. La rampe de force est alors appliquée en faisant varier r ([Evans et al., 1991], [Evans and Ritchie, 1997]) et la force vaut : $F = r.t$.

Dès lors, la force de rupture d'un lien est plutôt caractérisée par une distribution de forces de rupture et la force de rupture est définie comme la force à laquelle la probabilité de rupture est maximale (f^*) et dépend du taux de charge à laquelle elle est appliquée ([Merkel et al., 1999]) comme nous pouvons le voir sur la figure 2.4

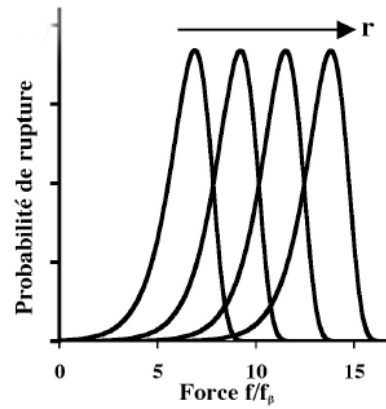


FIG. 2.4 – Probabilité de rupture en fonction de la force normalisée par f_β pour un taux de charge croissant (d'après [Pierrat, 2004])

Cette approche stochastique initiée par Evans nous permet de définir une probabilité de rupture $p(t, F)$ de la liaison à un instant t , soumise à une force $F(t)$. Cette probabilité de rupture est le produit du taux de dissociation $k_{\text{off}}(F)$ par la probabilité d'être à cet instant dans l'état lié $S(t)$. La probabilité de survie de la liaison est évaluée en considérant la probabilité de disparition de la liaison entre les instants t et $t + dt$:

$$\begin{aligned} S(t + dt) - S(t) &= -k_{\text{off}}(F(t)) \cdot S(t) dt \\ S(t) &= \exp \left\{ - \int_0^t k_{\text{off}}(F(u)) du \right\} \end{aligned} \quad (2.12)$$

La probabilité est donc donnée par l'équation 2.13 ([Evans and Ritchie, 1997]) :

$$p(t, F) = k_{\text{off}}(F) \exp \left\{ - \int_0^t k_{\text{off}}(F(u)) du \right\} \quad (2.13)$$

où $k_{\text{off}}(F)$ est la constante de dissociation en présence d'une force F . La force de rupture la plus probable est celle qui maximise la probabilité de rupture :

$$\left. \frac{\partial p}{\partial F} \right|_{f^*} = 0 \quad (2.14)$$

Pour une rampe de force F avec un taux de charge r_F l'équation précédente devient :

$$k_{\text{off}}(f^*) = r_F \left. \frac{\partial \ln k_{\text{off}}(F)}{\partial F} \right|_{f^*} \quad (2.15)$$

Grâce à cette relation, nous pouvons relier la force de rupture f^* mesurée au taux de charge r_F . Cette relation fait intervenir les propriétés intrinsèques de la liaison que sont la constante de dissociation à force nulle $k_{\text{off}}(0)$ et le paramètre de force d :

$$f^* = \frac{k_B T}{d} \ln \left(\frac{d}{k_{\text{off}}(0) k_B T} \right) + \frac{k_B T}{d} \ln(r_F) \quad (2.16)$$

Ainsi, si l'on trace la force de rupture mesurée en fonction du logarithme du taux de charge appliqué, la pente de la droite nous renseigne sur la valeur de d tandis qu'une extrapolation de la droite pour une force nulle nous permet d'estimer la constante de dissociation spontanée $k_{\text{off}}(0)$. Si la liaison LR présente non pas une seule barrière d'énergie, mais tout un paysage énergétique (plusieurs barrières d'énergie à franchir), cela se traduira par l'observation d'une suite de régimes linéaires ([Merkel et al., 1999], [Evans et al., 2001]).

2.2.3 Quelques techniques de mesures de temps de vie

Dans ce paragraphe, nous allons proposer une brève description de quelques techniques permettant de mesurer des constantes de dissociations.

Biomembrane Force Probe (BFP)

Cette technique fut initiée par Evans en 1991 ([Evans et al., 1991]). Elle consiste en l'approche de deux micropipettes présentant des vésicules ou des cellules recouvertes du couple ligand récepteur que l'on souhaite caractériser. Après un premier contact permettant la formation du lien, une micropipette est retirée (à vitesse constante ou suivant une rampe) et la force appliquée est mesurée par la déformation de la vésicule ou de la cellule (figure 2.5). Cette vésicule ou cellule, joue le rôle de ressort dont la constante de raideur est contrôlée par l'aspiration de la pipette. Ainsi, la gamme de forces applicables est étendue (de 0.01 pN à 1000 pN). Cette technique fut entre autres utilisée pour caractériser l'interaction biotine-streptavidine ([Merkel et al., 1999]) ou l'interaction entre un carbohydrate et une sélectine ([Evans et al., 2001]), figure 2.5.

Appareil à force de surface (SFA)

Initialement, la technique de SFA fut développée par Israelachvili dans les années 70 afin de mesurer des forces de Van der Waals ([J. N. Israelachvili and G. E. Adams, 1978]). Cet appareil consiste en l'approche de deux cylindres croisés recouverts d'une surface de mica pouvant être fonctionnalisée avec des couples ligands-récepteurs. Il est possible alors de mesurer les forces entre les deux surfaces en fonction de la distance qui les sépare avec une précision subnanométrique pour la distance et de 0.1 μN pour la force. Cette technique fut entre autres utilisée pour mesurer la constante de dissociation et donc le temps de vie

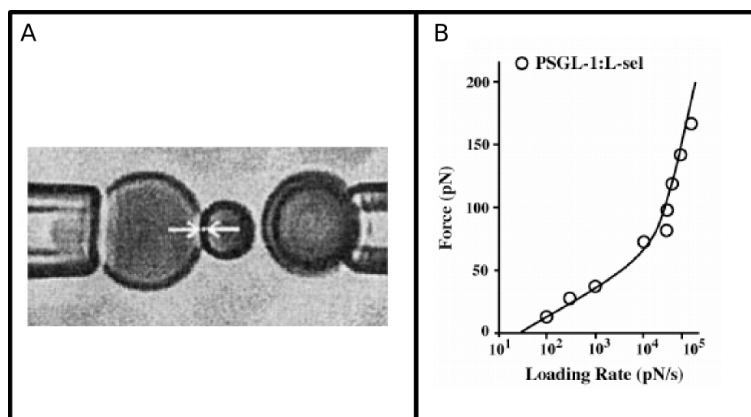


FIG. 2.5 – A : principe de la BFP. Un globule rouge dont la raideur est contrôlée par une micropipette sert de ressort. B : Spectre dynamique de force obtenu pour la liaison entre un ligand carbohydrate et la L-Sélectine d'après [Evans et al., 2001]. Une telle courbe caractérise la présence d'une double barrière.

de la liaison biotine-streptavidine ([Wong et al., 1997]) ou étudier l'interaction cadhérine-cadhérine ([Sivasankar et al., 1999], [Sivasankar et al., 2001]).

Les pinces optiques (OT)

Le principe de cette technique qui s'est rapidement développée consiste à focaliser un faisceau laser sur une particule afin de la piéger. Cette particule est recouverte d'un ligand pouvant interagir avec un récepteur se trouvant sur une surface. La force générée par la déflexion des photons sur la particule tend à la maintenir au centre du piège optique (point où le faisceau laser est focalisé). La gamme de forces est de l'ordre de 1 à 200 pN ([Stout, 2001]).

La microscopie à force atomique (AFM)

L'AFM est couramment utilisée afin de sonder les propriétés moléculaires d'interactions spécifiques : temps de vie, mesure de la force de rupture, paysage énergétique. Son principe est présenté sur la figure 2.6 : on enregistre la position d'une pointe d'AFM en fonction du déplacement de la pointe par rapport à une surface, pour plusieurs cycles approche - rétraction. Par l'intermédiaire du micro-levier au bout duquel la pointe est fixée, on obtient des courbes de forces en fonction du déplacement de la pointe. Un faisceau laser se réfléchit sur la pointe. La déflexion du micro-levier est alors mesurée par la déviation du faisceau laser. On peut appliquer des forces allant de 1 à 1000 pN et la rupture des liens résulte en un saut du micro-levier. Avec cette technique, il est aisé de modifier le taux de charge r appliqué (entre 100 et 10^5 pN/s). Récemment, Kienberger et al ([Kienberger et al., 2006]) étudièrent des couples antigène-anticorps en appliquant différents taux de charge : entre 2000 et 50000 pN/s. Ils ont obtenu des forces de rupture des différents couples antigène-anticorps allant de 70 à 170 pN, ce qui donne un paramètre de force d de 0.12 nm et une constante de dissociation de 6 s^{-1} .

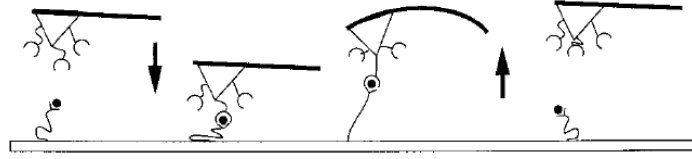


FIG. 2.6 – Principe de fonctionnement d'un AFM pour la mesure de forces : une pointe décorée par des ligands est approchée d'une surface recouverte de récepteurs. Ensuite, il suffit de retirer la pointe à vitesse donnée pour mesurer la force d'adhésion. Plusieurs cycles d'approche et de rétractation sont utilisés pour obtenir une statistique de rupture.

La chambre à flux

La chambre à flux est une technique permettant de disséquer les propriétés intrinsèques d'un couple ligand-récepteur et date des années 1980. Son principe consiste au suivi de cellules ou de billes recouvertes de ligands soumises à un cisaillement laminaire et se déplaçant sur une surface recouverte de récepteurs. Le cisaillement est suffisamment faible afin qu'un seul lien moléculaire parvienne à maintenir la particule à l'arrêt pendant un laps de temps détectable (figure 2.7, [Kaplansky et al., 1993]). Nous avons alors une visualisation directe d'un unique lien ligand-récepteur. Les trajectoires sont reconstruites avec des résolutions temporelles et spatiales de l'ordre de 20 ms et 40 nm ([Pierres et al., 2002]). A partir de l'enregistrement de multiples trajectoires, les temps d'arrêt sont comptabilisés. La constante de dissociation du lien peut alors être déterminée tant que l'interaction ligand-récepteur est médiée par un unique lien. Dans ce cas-là, on peut réécrire 2.5 :

$$\frac{d[C]}{dt} = -k_{\text{off}}[C] \quad (2.17)$$

La fraction des cellules adhérentes restant attachées après un temps t suit une loi exponentielle :

$$N(t) = N(0) \exp(-k_{\text{off}} t) \quad (2.18)$$

Ainsi, en traçant le logarithme du nombre de cellules encore immobiles à l'instant t après l'arrêt initial en fonction de t (on appellera cette courbe : courbe de détachement), la pente nous permet de remonter à $k_{\text{off}}(F)$ (figure 2.7).

La chambre à flux est donc une technique très pertinente pour appliquer des forces de faibles magnitudes et donc pouvoir déterminer des constantes de dissociations. Dans cette méthode d'analyse, plusieurs artefacts peuvent fausser les résultats. Tout d'abord, il faut s'assurer que les arrêts observés et décomptés sont bien dus à l'interaction spécifique et non pas à une interaction non spécifique. Afin de s'assurer de la spécificité, la meilleure méthode est de vérifier que le nombre d'événements d'adhésion décroît lors de l'ajout en solution de molécules bloquant l'adhésion. De plus, une courbe de détachement du premier ordre n'est pas forcément la signature d'une interaction médiée par un seul lien ([Pierres et al., 2006]), ([Zhu et al., 2002]). En effet, si la durée minimale d'arrêt détectable est trop importante, la

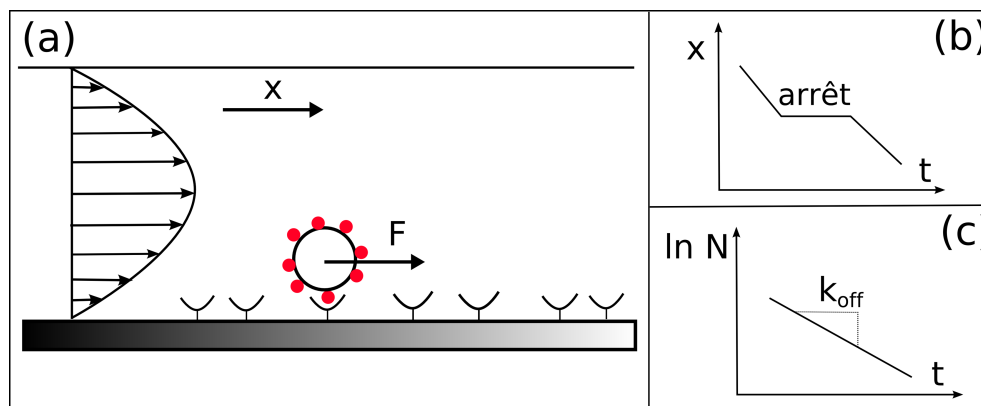


FIG. 2.7 – Principe de la chambre à flux. A : une particule recouverte de ligands est soumise à un cisaillement. Elle se déplace sur une surface recouverte de récepteurs. B : trajectoire obtenue après le suivi d'une particule et présentant un arrêt. C : détermination du nombre de cellules restant accrochées (N) en fonction du temps. La pente de la droite $\ln(N)$ nous permet de déterminer le $k_{\text{off}}(F)$.

rupture de liens multivalents pourra suivre une loi cinétique du premier ordre si la partie initiale de la courbe de détachement est manquante. A cela, on peut ajouter une cause systématique d'erreur : la définition d'un arrêt. Ainsi, une particule sera considérée comme arrêtée si elle se déplace d'une distance plus faible qu'un seuil arbitraire pendant une période de temps arbitraire ([Pierres et al., 2002]).

2.3 Dynamique sous écoulement près d'une paroi d'objets micrométriques sans interaction

De nombreuses études furent menées pour étudier le mouvement d'objets comme des globules rouges, des vésicules, des gouttes ou des capsules soumises à un cisaillement loin d'un substrat. Nous allons dans un premier temps nous intéresser au travail de Goldman ([Goldman et al., 1967]) qui a traité le mouvement d'une bille rigide proche d'un substrat soumise à un écoulement de cisaillement. Ensuite, nous nous intéresserons au mouvement d'objets à membrane fluide.

2.3.1 Billes rigides dans un écoulement de cisaillement : approche de Goldman

Goldman et ses collaborateurs furent les premiers à décrire la vitesse de déplacement et de rotation d'une sphère rigide de rayon R proche d'un substrat soumise à un écoulement de cisaillement et à la relier aux paramètres du système, paramètres définis sur la figure 2.8.

Leur approche nécessite la présence d'une couche de lubrification entre la sphère et la

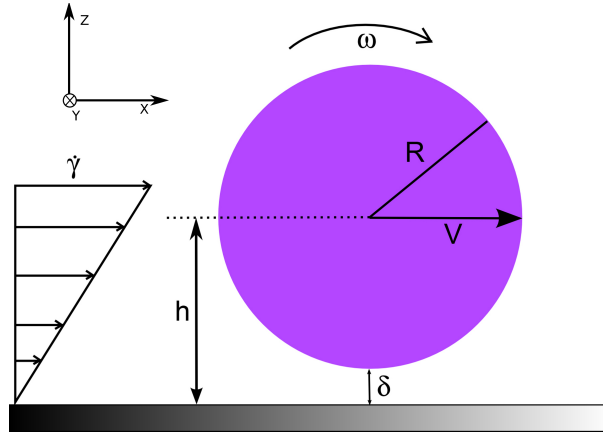


FIG. 2.8 – Définition des paramètres du système : V est la vitesse de translation de la bille de rayon R soumise à un cisaillement $\dot{\gamma}$, ω est sa vitesse de rotation. Le bas de la sphère se trouve à une distance δ du substrat.

surface. Ils calculent la force et le couple hydrodynamique s'exerçant sur la sphère en utilisant la linéarité des équations de Stokes, équations de Stokes² s'écrivant :

$$\eta \Delta V - \nabla p + f_{ext} = 0 \quad (2.19)$$

où η est la viscosité, V , le champ de vitesse de l'écoulement, p le champ de pression et f_{ext} les forces extérieures. A cette équation, nous devons ajouter l'équation décrivant l'incompressibilité du fluide :

$$\nabla \cdot V = 0 \quad (2.20)$$

Ils expriment la force F et le couple T qui s'exercent sur la sphère par la somme des contributions dues à la translation (t), à la rotation (r) et au cisaillement (s) :

$$F = F^t + F^r + F^s, \quad T = T^t + T^r + T^s \quad (2.21)$$

Nous allons nous intéresser à deux cas : un premier cas où la sphère ne présente pas de mouvement et un second cas où la sphère se déplace.

Force et couple exercés sur une sphère stationnaire

Si la sphère est stationnaire, alors elle ne présente plus de mouvement de translation ni de rotation. La composante restante qui s'applique sur la sphère est celle due au cisaillement. Nous pouvons écrire alors :

$$F_x^s = F_x^{s*} 6\pi\eta R h \dot{\gamma}, \quad T_y^s = T_y^{s*} 4\pi\eta R^3 \dot{\gamma} \quad (2.22)$$

²cette équation n'est valable qu'aux faibles nombres de Reynolds (10^{-5} à 10^{-2})

F_x^{s*} et T_y^{s*} sont des valeurs tabulées et elles dépendent du rapport h/R . Elles sont présentées sur le tableau 2.2 :

h/R	F_x^{s*}	T_y^{s*}
∞	1	1
10.0677	1.0587	0.99981
3.7622	1.1671	0.99711
2.3524	1.278	0.9901
1.5431	1.4391	0.97419
1.1276	1.616	0.95374
1.0453	1.6682	0.94769
1.005004	1.6969	0.94442
1.003202	1.6982	0.94427
1.0000	1.7005	0.94399

TAB. 2.2 – Valeurs tabulées de F_x^{s*} et T_y^{s*} pour une sphère sans mouvement dans un cisaillement

Les valeurs pour le cas $h/R = 1$ soit $\delta = 0$ sont obtenues par extrapolation. Ces valeurs nous serviront pour calculer la force s'exerçant sur une bille en adhésion dans le chapitre relatant de la chambre à flux 2.5.

Mouvement d'une sphère près d'une paroi dans un écoulement de cisaillement

Dans ce cas où la sphère se déplace sous l'effet du cisaillement, aucune autre force extérieure ne s'applique sur la bille et on peut réécrire 2.21 :

$$0 = F^t + F^r + F^s, \quad 0 = T^t + T^r + T^s \quad (2.23)$$

Ainsi, en adimensionnant les forces et les couples s'exerçant sur la sphère, l'équation précédente devient :

$$F_x^{t*} \left(\frac{V}{R\dot{\gamma}} \right) + F_x^{r*} \left(\frac{\omega}{\dot{\gamma}} \right) = -F_x^{s*} \left(\frac{h}{R} \right) \quad (2.24)$$

et

$$T_y^{t*} \left(\frac{V}{R\dot{\gamma}} \right) + T_y^{r*} \left(\frac{\omega}{\dot{\gamma}} \right) = -\frac{1}{2} T_y^{s*} \quad (2.25)$$

La résolution de ce système nous permet d'obtenir les équations reliant les vitesses de translation et de rotation au taux de cisaillement et à δ (on rappelle qu'ici $h = R + \delta$) :

$$\frac{\omega}{\frac{1}{2}\dot{\gamma}} = \frac{2(h/a)F_x^{s*}T_y^{t*} - F_x^{t*}T_y^{s*}}{F_x^{t*}T_y^{r*} - F_x^{r*}T_y^{t*}} \quad (2.26)$$

$$\frac{V}{h\dot{\gamma}} = \frac{\frac{1}{2}(R/h)F_x^{r*}T_y^{s*} - F_x^{s*}T_y^{r*}}{F_x^{t*}T_y^{r*} - F_x^{r*}T_y^{t*}} \quad (2.27)$$

Goldman et ses collaborateurs ont calculé numériquement toutes les quantités adimensionnées afin d'obtenir ces deux équations :

$$\frac{V}{\dot{\gamma}h} = \frac{0.7431}{0.6376 - 0.2 \ln(\delta/R)} \quad (2.28)$$

$$\frac{\omega}{\frac{1}{2}\dot{\gamma}} = \frac{0.8436}{0.6376 - 0.2 \ln(\delta/R)} \quad (2.29)$$

Il est à noter que ces 2 équations ne sont valables que dans la limite où $\delta/R \ll 1$. En regroupant ces deux équations, on obtient comment varie le rapport vitesse de roulement sur vitesse de translation en fonction de δ/R :

$$\frac{\omega R}{V} = \frac{0.5686}{1 + \delta/R} \quad (2.30)$$

2.3.2 Mouvements d'objets non sphériques à membrane fluide près d'une paroi

Contrairement à une sphère rigide, les objets fluides déformables (gouttes, globules rouges, vésicules) soumis à un cisaillement peuvent s'écarter de la forme sphérique, rendant le traitement analytique et numérique plus complexe. Loin d'une paroi, Keller et Skalak [Keller and Skalak, 1982] proposèrent un modèle analytique afin de décrire le mouvement d'un ellipsoïde à membrane fluide présentant un mouvement de chenille de char³. Kraus et ses collaborateurs [Kraus et al., 1996] rajoutèrent la déformabilité dans des simulations tridimensionnelles. Ce type de mouvement fut observé expérimentalement sur des globules rouges [Fischer et al., 1978] ou des vésicules [de Haas et al., 1997] (et dépend des rapports de viscosité entre l'intérieur et l'extérieur de l'objet et de sa déformabilité). Nous allons dans la suite nous intéresser à l'effet de la présence d'une paroi sur le mouvement de ces objets.

Résultats théoriques

Nous allons présenter des résultats théoriques décrivant le comportement de vésicules déformables à membrane fluide proches d'une paroi et soumises à un cisaillement.

³déplacement de l'objet caractérisé par la rotation de la membrane autour du centre de masse de l'objet et une orientation stationnaire par rapport à la direction de l'écoulement

Calculs analytiques Olla [Olla, 1997] s'intéressa à la détermination numérique du mouvement de vésicules sans poids. Il prédit un soulèvement de la vésicule s'accompagnant d'un mouvement de chenille de char de la membrane à orientation stationnaire. Il obtient alors une loi de variation de la vitesse d'éloignement ou vitesse de drift V_d en fonction du rayon R de la vésicule et de la distance à la paroi h . Ce résultat prédit alors une force de portance qui éloigne la vésicule de la paroi, dont l'origine prend naissance dans la déformabilité et la fluidité de la membrane de l'objet. Cette force de portance fut aussi mise en évidence par des calculs numériques présentés dans le paragraphe suivant.

Seifert [Seifert, 1999] proposa une autre approche en utilisant un modèle de sphère tronquée indéformable mais orientable dont la surface reste fluide. L'orientation de la sphère conduit à une asymétrie suffisamment importante pour faire apparaître une force de portance.

Calculs numériques 2D Cantat et Misbah ont proposé un calcul numérique à 2D pour des vésicules en légère adhésion non spécifique sur une paroi et soumises à un cisaillement [Cantat and Misbah, 1999]. La vésicule est au départ en adhésion faible sur la paroi et présente une forme symétrique. Dès l'application du cisaillement, la vésicule se déforme. Plus le taux de cisaillement augmente et plus la vésicule se déforme jusqu'à décoller, en prenant une forme elliptique avec une inclinaison stationnaire, forme prédite par Kraus [Kraus et al., 1996], et Keller et Skalak [Keller and Skalak, 1982].

Calculs numériques 3D Une étude numérique tridimensionnelle fut menée par Sukumaran et Seifert [Sukumaran and Seifert, 2001]. Numériquement, une vésicule sans poids, proche d'une paroi et soumise à un écoulement de cisaillement va s'incliner selon une orientation stationnaire. Cette inclinaison induit alors un champ de pression asymétrique donnant naissance à une force de portance d'origine visqueuse. La vésicule se déplace et la membrane de la vésicule a un mouvement de chenille de char. Ils estiment alors que la force de portance est reliée à la vitesse d'éloignement et est donc directement proportionnelle au taux de cisaillement.

Observations de vésicules proches d'une paroi, soumises à un écoulement de cisaillement.

Nous allons présenter des résultats expérimentaux décrivant le comportement de vésicules déformables à membrane fluide proches d'une paroi soumises à un cisaillement.

Expériences de Lorz et coll. Lorz et ses collaborateurs mirent des vésicules en adhésion faible et dans un écoulement de cisaillement [Lorz et al., 2000]. Ils observèrent en RICM (Reflection Interference Contrast Microscopy) (voir chapitre 6.1.2) le déplacement de la vésicule. Outre un mouvement sans glissement observé, ils affirment que la vésicule se détache du substrat et se déplace à une hauteur de 100 nm. Ils imputent cela à une force de portance s'opposant au poids de la vésicule et à la force d'adhésion d'origine électrostatique.

Expériences de Abkarian et coll. Des études plus systématiques et poussées sur le déplacement de vésicules proches d'une paroi dans un écoulement de cisaillement furent menées

par Abkarian et ses collaborateurs [Abkarian and Viallat, 2005], [Abkarian et al., 2002]. Ils ont observé pour des vésicules présentant des taux de dégonflement différents, la déformation induite par le cisaillement et l'apparition de la force de portance faisant décoller les vésicules de la surface, comme nous pouvons le voir sur la fig 2.9.

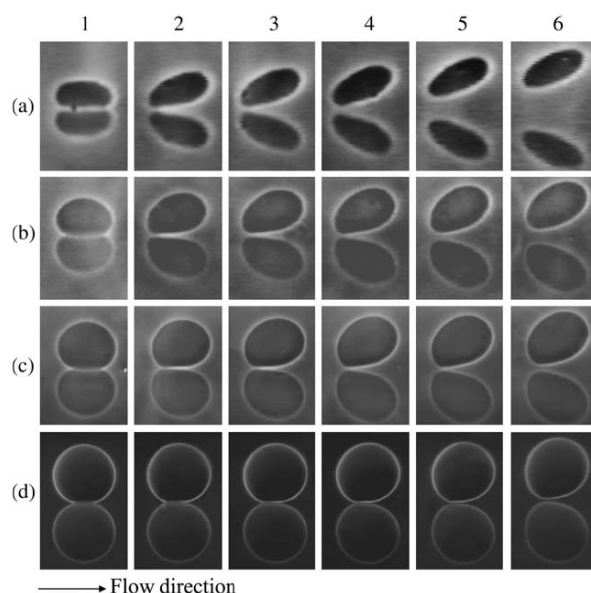


FIG. 2.9 – La force de portance décolle les vésicules de la surface [Abkarian and Viallat, 2005]. Chaque ligne représente la déformation d'une vésicule pour différents taux de cisaillement. Grâce à la réflexion de la vésicule par rapport à la surface, nous voyons clairement le décollement des vésicules.

Les vésicules se déplacent dans un mouvement de chenille de char. Quand la force de portance est suffisamment importante pour faire décoller les vésicules d'une hauteur h , ils montrent que cette hauteur augmente de façon linéaire avec le taux de cisaillement appliqué renormalisé par le taux de cisaillement permettant le décollage. Dans ce régime, la force de portance compense exactement le poids de l'objet. Par rapport à Sukumaran et Seifert [Sukumaran and Seifert, 2001], ils obtiennent une courbe maîtresse indiquant la valeur de la force de portance dès que l'on connaît la masse, la taille et le taux de dégonflement de l'objet. Ils montrent clairement qu'une telle force (pouvant atteindre 250 pN) ne peut être négligée lors de l'étude d'objets déformables en adhésion sur une surface dans un écoulement de cisaillement (par exemple des leucocytes).

Les simulations numériques et les calculs analytiques prédisent une force de portance soulevant un objet fluide et déformable soumis à un cisaillement. Des expériences ont confirmé ces prévisions et ont permis la quantification de cette force.

2.4 Les effets de l'adhésion sur le mouvement d'objets : modèles/simulations

2.4.1 Force s'exerçant sur une bille accrochée à une surface via un lien unique dans un écoulement de cisaillement

Dans le cas d'un lien unique, nous pouvons estimer la force s'exerçant sur celui-ci en reprenant l'approche de Goldman (équation 2.22). En effet, nous pouvons calculer la force F et le couple T s'exerçant sur une particule sphérique adhérente (on considère alors que $\delta = 0$ et donc $h = R$, le rayon de la particule), par l'intermédiaire d'un seul lien :

$$F = 32.05\eta R^2 \dot{\gamma} \quad (2.31)$$

$$T = 11.86\eta R^3 \dot{\gamma} \quad (2.32)$$

Ainsi, pour une particule de $10 \mu\text{m}$ de diamètre soumise à un flux de 5 s^{-1} dans l'eau, la force F vaut 4 pN. Grâce à ces deux expressions, nous pouvons déterminer la tension T_{lien} s'exerçant sur le lien de longueur L [Pierres et al., 1995] :

$$T_{\text{lien}} \approx (F + T/R) \sqrt{R/2L} \quad (2.33)$$

Ainsi, la force que ressent un lien d'une longueur de 20 nm pour une particule de $10 \mu\text{m}$ de diamètre soumise à un cisaillement de 5 s^{-1} vaut 44.71 pN.

Nous allons aborder les modèles et les simulations permettant de rendre compte du déplacement d'objets micrométriques recouverts de ligands sur une surface recouverte de récepteurs.

2.4.2 Modèles de pelage

Ce que l'on entend par pelage est la brisure les uns après les autres de liens adhésifs entre une membrane et une surface sous l'effet d'une force extérieure.

Modèle de Dembo et ses collaborateurs

Dembo et ses collaborateurs [Dembo et al., 1988] ont associé le caractère statistique des liaisons et les propriétés mécaniques de la membrane afin de décrire le détachement de cellules soumises à une force extérieure. La situation étudiée est présentée sur la figure 2.10. Une membrane attachée à une extrémité est en adhésion sur une surface via plusieurs liaisons. La membrane subit une force extérieure T_{fx} à un angle θ_{fx} afin de la détacher de la surface.

Les auteurs ont résolu numériquement ce problème à partir des taux de formation et de dissociation des liens, chaque lien étant modélisé par un ressort de raideur K . Ainsi en

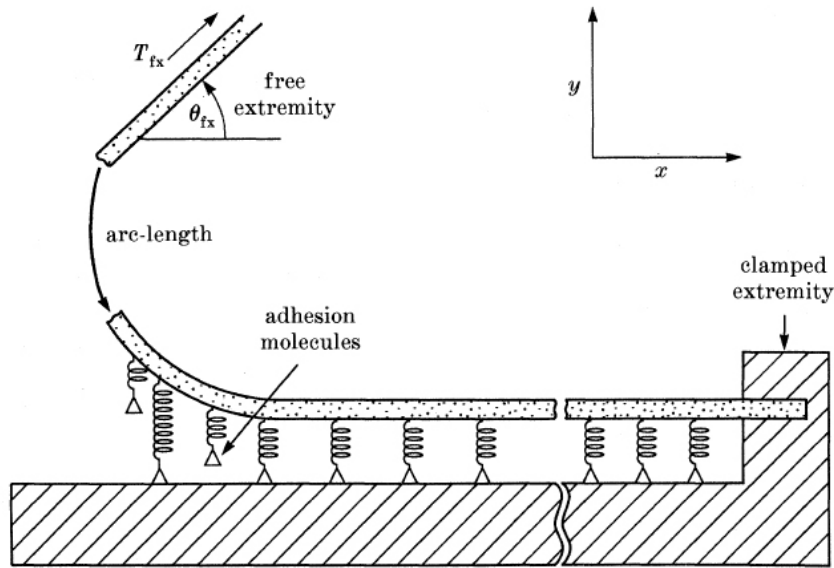


FIG. 2.10 – Schéma de la modélisation du détachement cellulaire proposé par Dembo et coll (d'après [Dembo et al., 1988]).

utilisant une loi de Boltzmann, ils obtiennent l'équation suivante pour la constante d'affinité d'un lien sous tension K_A :

$$K_A = K_A(\lambda) \exp\left(\frac{-K(x_m - \lambda)^2}{2k_B T}\right) = \frac{K_{\text{on}}(x_m)}{K_{\text{off}}(x_m)} \quad (2.34)$$

où $K_A(\lambda)$ est la constante d'affinité pour des liens non sollicités, x_m la longueur du lien sous tension, λ la longueur du lien à l'équilibre, $k_B T$ l'énergie thermique (produit de la constante de Boltzmann par la température) et $K_{\text{on}}(x_m)$ et $K_{\text{off}}(x_m)$ les taux de formation et de dissociation du lien sous tension. Les auteurs calculent alors la tension critique T_{crit} requise pour empêcher la membrane de s'étaler sur la surface. Au-delà de cette valeur, la membrane se détache de la surface. Cette tension critique est explicitée dans la formule suivante :

$$T_{\text{crit}} = \frac{k_B T n \ln(1 + K_A(\lambda))}{(1 + \cos(\theta_{fx}))} \quad (2.35)$$

où n est la densité totale de lien (liens libres et liens formés). On peut noter que cette relation est analogue à la relation d'Young. De plus, cette tension ne tient compte ni d'éventuels effets répulsifs ou attractifs non spécifique, ni de la diffusion latérale des liens.

Modèle proposé par Garrivier et ses coll

Garrivier et ses collaborateurs [Garrivier et al., 2002] ont proposé un modèle du décollement d'un objet en adhésion sur un substrat, adhésion se faisant via des liaisons discrètes et selon la figure 2.11. Dans ce modèle, seule la contrainte appliquée est importante, les auteurs ne prenant pas en compte les problèmes de l'hydrodynamique.

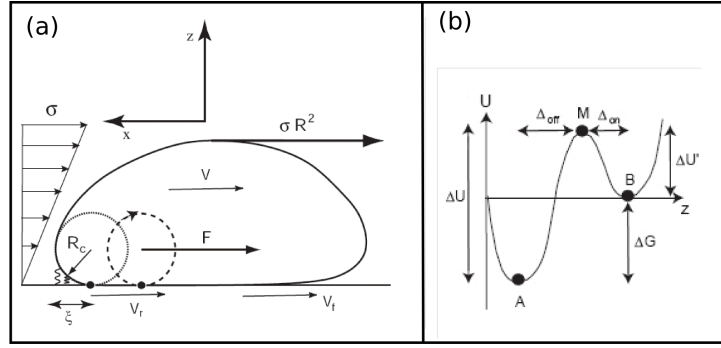


FIG. 2.11 – (a) :Schéma décrivant la zone adhésive proche de la ligne de contact d'après [Garrivier et al., 2002]. La contrainte hydrodynamique à la paroi (σ en Pa) est principalement concentrée sur le haut de la cellule de rayon R . La force totale est proportionnelle à σR^2 . V est la vitesse de centre du masse de la cellule, ξ la largeur de la ceinture adhésive et R_c le rayon du cercle osculateur modélisant la ceinture adhésive soumise à la force F . Quand la cellule est pelée de la surface, le cercle osculateur roule sans glisser. (b) : Paysage énergétique d'un lien dans le modèle de Garrivier et coll. A correspond à l'état lié et B à l'état libre.

Les liaisons sont modélisées par des ressorts de raideur K , les liens se trouvant à une hauteur z de la surface et pouvant diffuser latéralement. Le paysage énergétique d'un lien est présenté sur la figure : 2.11 et les taux de dissociation, d'association et la constante d'équilibre K_e sont déterminés à partir de la théorie de Kramers. Ainsi, pour un lien sous tension, les auteurs obtiennent les taux de dissociation ($k_{off}(z)$) et d'association ($k_{on}(z)$) présentés à l'équation 2.36

$$k_{off}(z) = k_{off}(0) \exp \left[\frac{\Delta_{off} K z}{k_B T} \right] \quad k_{on}(z) = k_{on}(0) \exp \left[\frac{-\Delta_{on} K z}{k_B T} \right] \quad (2.36)$$

où Δ_{off} et Δ_{on} sont définis dans la figure 2.11 et $k_{off}(0)$ et $k_{on}(0)$ sont les constantes de dissociation et d'association à force nulle.

Outre la mise en évidence d'une force seuil à partir de laquelle la membrane peut commencer à être détachée du substrat, les auteurs parviennent à relier les paramètres expérimentaux à des résultats analytiques.

Ainsi, les auteurs obtiennent la relation suivante entre la vitesse de pelage et la force appliquée :

$$v(F) = v_0 \left(\frac{F'_0}{F} \right) \exp \left(\frac{F}{F'_0} \right) \quad (2.37)$$

en posant et

$$F'_0 = 4F_0 / (1 + K_e^{-1}) \simeq 4F_0 \quad (2.38)$$

$$v_0 = k_{off}(0) (R_c k_B T / 2 \Delta_{off})^{1/2} \quad (2.39)$$

$$F_0 = \frac{n_0}{8K} \left(\frac{k_B T}{\Delta_{off}} \right)^2 \quad (2.40)$$

où n_0 est la densité de liens. La force F est reliée à la contrainte par la relation suivante : $F = \sigma \frac{R^3}{LR_c}$. Enfin, les auteurs, en prenant en compte la pré-contrainte σ_e à l'équilibre pour $F=0$ appliquée par les liens et la contrainte critique permettant le détachement de la membrane (σ_c), parviennent à relier la constante d'équilibre K_e à la contrainte appliquée par l'équation 2.41 dans la limite d'une adhésion forte :

$$\frac{\sigma_{1/2}}{\sigma_0} \equiv \frac{\sigma_c - \sigma_e}{\sigma_0} = \left[\ln(K_e)^2 + \frac{\pi^2}{3} - 2 \right] \quad (2.41)$$

Leur modèle permet de reproduire des comportements observés expérimentaux ([Thoumine et al., 1996]) et de déterminer des paramètres microscopiques relatifs à la liaison étudiée (énergie de la liaison, constantes cinétiques d'association et de dissociation à force nulle par exemple). La grande différence entre les deux modèles présentés est que le modèle de Dembo et ses coll. ne prévoit pas de force limite afin de détacher la membrane de la surface, force prédite par la théorie de Garrivier et ses coll et observée expérimentalement [Thoumine et al., 1996]. De plus, dans le modèle de Garrivier et coll., la force appliquée est d'origine hydrodynamique et dépend de la contrainte hydrodynamique alors que dans le modèle proposé par Dembo et coll., la tension appliquée à la membrane n'est pas explicitée.

2.4.3 Modélisation par Hammer

Hammer s'intéressa à modéliser et à simuler la dynamique de déplacement d'objets micrométriques en adhésion dans un écoulement de cisaillement. Nous allons nous intéresser à un article en particulier dans lequel il établit un diagramme d'état du mouvement d'un leucocyte [Chang et al., 2000]. La figure suivante illustre sa méthode de modélisation et de simulation 2.12.

Les liens entre les molécules d'adhésion de la cellule et de la surface sont modélisés à l'aide de ressorts dont la force f d'écrit :

$$f = K(L - \lambda) \quad (2.42)$$

avec K la constante de raideur, L la longueur du lien une fois attaché et λ la longueur à l'équilibre. Le taux de dissociation $k_r(F)$ est modélisé en utilisant la loi de Bell :

$$k_{\text{off}}(F) = k_r^0 \exp\left(\frac{\gamma F}{k_B T}\right) \quad (2.43)$$

γ équivaut à d dans la loi de Bell définie en 2.11. Le taux d'association k_{on} va dépendre de la hauteur h et de la vitesse de glissement de l'objet. Ainsi, ils assument que k_{on} est égal à sa valeur maximale ($k_{\text{on}}^0(V_s)$) tant que h est plus petit que H_c . Sinon, k_{on} vaut 0. Ainsi, à chaque étape de la simulation, la formation et la dissociation des liens est calculée par une simulation de Monte Carlo. La force totale retenant la cellule est calculée en sommant les forces de chaque lien. A cela, ils ajoutent une force colloïdale répulsive pour mimer la présence du Glycocalyx et d'éventuelles interactions électrostatiques, tendant à repousser la cellule de la paroi. Enfin, la force et le couple exercés par le cisaillement sont calculés à partir des

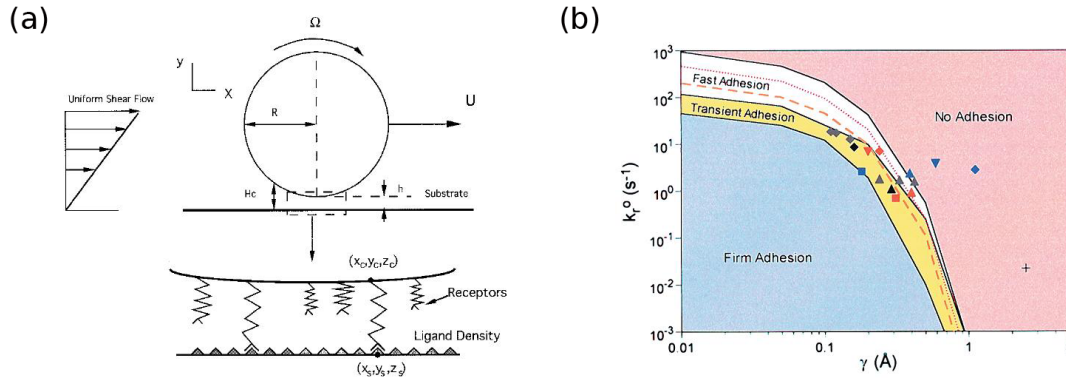


FIG. 2.12 – (a) : Schéma représentant l'adhésion d'une cellule à une surface. Les récepteurs sont modélisés par des ressorts. La cellule se trouve à une distance h de la surface et seuls les récepteurs se trouvant dans la région définie par H_c sont réactifs. (b) : Diagramme d'état de l'adhésion d'un leucocyte. Quatre états sont déterminés. Ces états ne dépendent que des propriétés intrinsèques de l'interaction : γ et k_r^0 . Les différents points sont des valeurs obtenues dans la littérature. (D'après [Chang et al., 2000]).

équations de Goldman 2.3.1, [Goldman et al., 1967]. A partir de données récupérées dans différents articles, les auteurs obtiennent un diagramme d'état d'un leucocyte se déplaçant en adhésion, présenté sur la figure 2.12 (b). En faisant simplement varier les valeurs de γ et k_r^0 , les auteurs définissent quatre états d'adhésion qui furent observés expérimentalement (losanges, carrés, croix et triangles sur le diagramme) : un état non adhésif où l'objet se déplace à vitesse, V , constante, cette vitesse est supérieure à 50 % de sa vitesse hydrodynamique V_H calculée pour une distance séparant l'objet de la paroi de 50 nm ; un état d'adhésion ferme où l'objet reste accroché définitivement sur la surface ; un état d'adhésion transitoire où le roulement des cellules est entrecoupé de moments d'adhésion forte ; un état d'adhésion rapide présentant du roulement⁴ à une vitesse $V < 0.5 V_H$; et un état de saltation où le déplacement de l'objet à V_H est entrecoupé d'arrêt (figure 2.12 (b)). Ainsi, cette simulation montre l'importance du taux de dissociation à force nulle et de γ , une longueur typique d'interaction vis-à-vis du mouvement des leucocytes. Dans des études plus récentes, ils complexifièrent leur modèle en rajoutant une déformabilité aux liens [Caputo and Hammer, 2005] ou bien en considérant que dans le flux sanguin les leucocytes ne se trouvent pas dans un environnement dilué de cellules mais au milieu de plusieurs autres cellules, cellules modifiant les conditions d'écoulement du flux [King and Hammer, 2001]. Ce modèle utilise les forces hydrodynamiques pour modéliser la dynamique d'une bille en adhésion, contrairement aux modèles de pelages précédemment présentés.

⁴Ce que l'on nomme roulement est le déplacement des objets en adhésion.

2.4.4 Modèle de cinétique de détachement

Cozens et coll [Cozens-Roberts et al., 1990b] [Cozens-Roberts et al., 1990c] ont adapté un modèle développé par Hammer et coll [Hammer and Lauffenburger, 1987] (dont les ingrédients sont présentés précédemment) afin de décrire le détachement de billes de latex dans des expériences en chambre à flux radial [Cozens-Roberts et al., 1990a]. Les paramètres géométriques du modèles sont définis dans la figure 2.13. Dans cette approche, les liens sont

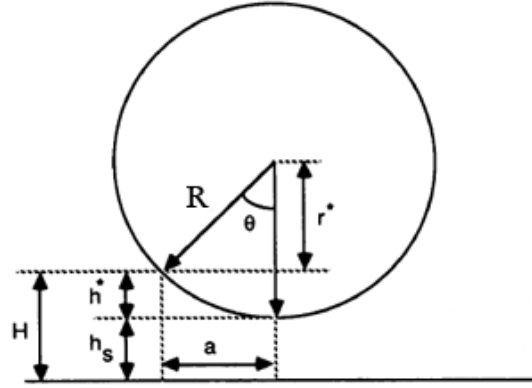


FIG. 2.13 – Représentation schématique d'une bille en adhésion sur une surface. a est le rayon de la longueur de contact, R est le rayon de la bille. H est la distance maximale de formation d'un lien.

supposés être contraints de la même façon. Leur modèle prévoit un cisaillement critique permettant le détachement des billes. Ce cisaillement s'écrit :

$$\dot{\gamma}_c = N_l N_r \beta \quad (2.44)$$

$$\beta \propto (a/R)^3 \quad (2.45)$$

avec N_l la densité de ligands, N_r la densité de récepteurs, a le rayon de la zone de contact et R le rayon de la bille. On peut relier a à R par des considérations géométriques :

$$a = R \sin(\theta) \quad (2.46)$$

et

$$\cos(\theta) = \frac{R - h^*}{R} \quad (2.47)$$

$$\cos(\theta) = \frac{R - H + h_s}{R} \quad (2.48)$$

$$\cos(\theta) = \frac{R - \text{constante}}{R} \quad (2.49)$$

$$\cos(\theta) = 1 - \frac{\text{constante}}{R} \quad (2.50)$$

En supposant que θ est petit, on obtient : $a \approx R\theta$ et $\theta \approx 1/\sqrt{R}$. Ainsi en considérant que la bille est sphérique, on relie a à R par la relation suivante :

$$a \approx R^{1/2} \quad (2.51)$$

2.5 Observations des effets de l'adhésion sur le mouvement d'objets

Afin d'observer les comportements d'objets micrométriques adhésifs dans un écoulement de cisaillement, l'utilisation de la chambre à flux est nécessaire.

2.5.1 Quelques études d'objets micrométriques en adhésion soumis à un cisaillement.

Nous allons à présent nous intéresser à quelques résultats obtenus par la méthode de la chambre à flux.

Cinétique de dissociation de lien entre des neutrophiles activés et des cellules endothéliales.

Kaplanski et ses collaborateurs ([[Kaplansky et al., 1993](#)]) se sont intéressés à observer le mouvement de globules blancs sur des cellules endothéliales dans un écoulement de cisaillement faible (5.25 s^{-1}). Les forces appliquées sont de l'ordre de 5 pN. Ils observent qu'en rajoutant de l'anti E-Selectin, la fréquence d'arrêt chute. Cela suggère que les comportements observés sont principalement dus à une interaction entre les récepteurs de la E-Selectine se trouvant sur les cellules endothéliales et leur ligand sur les globules blancs. La détermination de la position des globules blancs se fait à $0.42 \text{ } \mu\text{m}$ près et ils considèrent qu'une particule est arrêtée si elle se déplace de moins de $2.4 \text{ } \mu\text{m}$ pendant 0.9 s. Le fait que les cellules repartent après un arrêt à la même vitesse que la vitesse qu'ils avaient avant de s'arrêter indique une interaction via un unique lien. A partir de l'étude de la durée des arrêts transitoires, ils obtiennent un taux de dissociation de 0.5 s^{-1} et donc une durée de vie moyenne de 2 s.

Temps de vie de la liaison P-Selectine-PSGL1.

Alon et ses collaborateurs ([[Alon et al., 1995](#)]) se sont intéressés par la mesure de temps de vie d'un lien entre la P-Selectine et la PSGL1 un ligand se trouvant sur les neutrophiles. Pour cela, une surface est recouverte d'une bicouche lipidique dans laquelle est ancrée des P-Selectine. Cette surface est installée dans une chambre à flux et des neutrophiles sont injectés. Le déplacement des neutrophiles est enregistré avec une précision de $0.7 \text{ } \mu\text{m}$ pour des taux de cisaillement allant de 17 à 73 s^{-1} . Les neutrophiles roulent sur la surface dans un mouvement saccadé. Pendant le roulement, les cellules s'arrêtent de temps en temps. En diminuant la densité en P-Selectine (jusqu'à un site par μm^2), les mouvements saccadés sont

plus présent et on peut observer entre les moments où la cellule roule ou elle est accrochée des déplacements linéaires à la vitesse imposée par le flux. Un arrêt est défini comme transitoire s'il est séparé d'un autre arrêt par un déplacement d'au moins $50\ \mu\text{m}$ à la vitesse hydrodynamique et qu'il n'y a pas de roulement pendant l'arrêt (un déplacement inférieur à $1\ \mu\text{m}$). Par contre, les auteurs ne précisent pas comment ils définissent un arrêt. L'ajout de molécules rentrant en compétition avec l'interaction diminue fortement le nombre d'événements observés. Les arrêts suivent une loi cinétique de dissociation du premier ordre et le taux de dissociation augmente quand le taux de cisaillement est augmenté. Les auteurs en concluent qu'ils observent des événements dus à un lien unique et que le taux de dissociation suit la loi de Bell. Par un modèle géométrique simple, ils calculent la force exercée sur le lien unique et déterminent le taux de dissociation à force nulle et d , le paramètre de force. Ils obtiennent donc $k_{\text{off}}(0) = 0.95\ \text{s}^{-1}$, valeur en accord avec [Kaplansky et al., 1993] et avec [M. K. Wild et al., 2001]. Le paramètre de force d vaut $0.049\ \text{nm}$, valeur consistante avec celle obtenue pour des liaisons hydrogènes soit un $f_{\beta} = 120\ \text{pN}$.

Etude du roulement de microsphères médié par l'interaction L-Selectin/Sialyl Lewis^x.

Greenberg et ses collaborateurs se sont intéressés au mouvement de microsphères recouvertes de sialyl Lewis^x (sLe^x) sur une surface présentant des L-Sélectine [Greenberg et al., 2000]. Cette interaction est prépondérante dans le roulement des neutrophiles et est un prérequis à leur adhésion ferme sur les cellules endothéliales. Les neutrophiles sont mimés par des microsphères de latex de $10.9\ \mu\text{m}$ de diamètre et recouverte de sLe^x alors que la surface est recouverte de L-Sélectine dans des densités comprises entre 400 et 2000 sites/ μm^2 . Les microsphères sont alors placées dans une chambre à flux et soumises à des cisaillement allant de 0.5 à $3.5\ \text{dyn/cm}^2$. Une microsphère présente un comportement de roulement dès qu'elle se déplace à une vitesse qui est au moins 50% plus faible que la vitesse calculé pour une microsphère se déplaçant librement sous l'effet du cisaillement. Cette vitesse de déplacement libre est calculée en utilisant la théorie de Goldman ([Goldman et al., 1967], 2.3.1) pour une bille d'un diamètre de $10.9\ \mu\text{m}$ de diamètre et se trouvant à une distance à la paroi de $50\ \text{nm}$. Le choix de cette distance est justifiée par le fait qu'à cette distance, la microsphère peut encore interagir avec les molécules présentes à la surface. Une microsphère sera considérée comme attachée de façon ferme tant qu'elle ne présente aucun mouvement pendant au minimum 10 s. Soumises à un cisaillement de plus en plus grand, les microsphères roulent à des vitesses de plus en plus grande (une augmentation d'un facteur cinq du flux s'accompagne d'une augmentation d'un facteur huit dans la vitesse de roulement). Ce résultat est cohérent avec des expériences menées sur des neutrophiles. En diminuant la densité de sites de L-Sélectine sur leur surface, les auteurs observent une augmentation dans la vitesse moyenne de déplacement des microsphères. Ainsi pour des densités de 400 sites/ μm^2 , les microsphères s'arrêtent brièvement puis repartent sans mouvement de roulement avec de fortes variations de vitesses. En faisant varier la densité de sites, ils mesurent le taux de roulement pour différents flux imposés. Le taux de roulement est le nombre de microsphères en roulement (une microsphère ne sera comptée que si elle se déplace d'au moins 10 fois son diamètre) rapporté au temps d'observation et au champ de vision. A forte densité de site (2000 et 1500 sites/ μm^2) une augmentation du cisaillement induit une diminution du taux de roulement. Par contre, pour des densités de 1100 et 800 sites/ μm^2 , il apparaît un flux mi-

nimum (0.7 dyn/cm^2) afin d'obtenir des valeurs du taux de roulement maximales. De plus, décroître la densité décroît la valeur maximale du taux de roulement. Les auteurs ont mis en évidence un effet de seuil du cisaillement dans le comportement des microsphères pour des densités faibles. Ce seuil observé fut aussi rapporté dans d'autres expériences et peut être expliqué par le fait qu'une augmentation du cisaillement augmente le nombre de rencontres entre un ligand et un récepteur. Ainsi dans certain cas, augmenter le cisaillement permet d'augmenter l'adhésion.

Cinétique de détachement de *Dictyostelium discoideum*.

Décavé et coll. [Décavé et al., 2002] ont étudié la cinétique de détachement de l'amibe *Dictyostelium discoideum* soumise à un flux hydrodynamique. Ils montrent que les cellules ne se détachent qu'à partir d'un cisaillement seuil dépendant de la nature de l'interaction entre la cellule et la surface et de la taille de la cellule. Les cellules se détachent selon une loi cinétique du premier ordre, loi ne dépendant que du cisaillement appliqué. Les courbes de détachements sont très bien ajustées par le modèle de pelage présenté au paragraphe 2.4.2. Les auteurs montrent aussi que la force seuil de détachement n'est pas affectée par la dépolymérisation de l'actine alors que la cinétique de détachement est grandement affectée par la dépolymérisation de l'actine.

2.6 Conclusions

Dans ce chapitre, nous avons montré que l'adhésion non-spécifique rentre en compétition avec l'adhésion spécifique et qu'il est nécessaire de prendre en compte l'adhésion non-spécifique. L'étude de l'adhésion spécifique est rendue possible par de nombreuses techniques (chambre à flux, BFP, micropipettes...) et permet de disséquer les propriétés intrinsèques des couples récepteurs/ligands comme le temps de vie de la liaison par exemple. Les études ont surtout été menées dans l'optique de déterminer des constantes d'association, de dissociation, des temps de vie mais peu se sont intéressées à étudier plus précisément les mouvements d'objets sous écoulement hydrodynamique en adhésion. Hammer [Chang et al., 2000] a montré qu'en modifiant les caractéristiques d'une liaison, on peut explorer différents régimes d'adhésion. Notre approche souhaite concilier l'utilisation d'un unique couple ligand/récepteur afin de sonder ces différents régimes.

Chapitre 3

Choix du système expérimental

Dans ce chapitre, nous allons aborder en détail l'interaction spécifique que nous avons retenue : la chélation d'un ion nickel par deux histidines. Après avoir justifié ce choix, nous présenterons les différents objets micrométriques que nous avons utilisés : les billes et les vésicules.

3.1 La chélation : une interaction spécifique

Un ion métallique ne se trouve jamais seul en solution, mais plutôt en combinaison avec des ligands ou des groupes chélatants. Ces associations donnent naissance à des complexes ioniques ou des composés de coordination.

Ces complexes contiennent un atome central, ou un ion, et un groupement d'ions ou de molécules neutres autour de lui.

La chélation (prononcer *kélassion*, du grec *khêle* : « pince ») est un processus physico-chimique au cours duquel est formé un complexe, le chélate, entre un complexant, dit chélateur (ou chélatant), et un métal, alors complexé, dit chélaté. Le chélate se distingue du simple complexe par le fait que le métal peut se fixer au chélateur par au moins deux liaisons de coordination, à la manière d'une pince. En fonction du nombre de liaisons chélatantes, on parle de coordinats bidentés, tridentés, tétradentés, etc ...

La chélation est mise à profit à différentes échelles. Ainsi au niveau macroscopique, on utilise le processus de chélation pour la fabrication d'antidotes lors de l'empoisonnement dû à une intoxication par des poisons métalliques. L'antidote va alors former avec le poison un chélate qui sera éliminé. Elle peut aussi être utilisée afin de décontaminer des sols pollués par des métaux.

Outre les deux précédents aspects macroscopiques, la chélation est un phénomène naturel fondamental dans le monde "microscopique" : par exemple, le cobalt dans la vitamine B12 (jouant un rôle primordial dans la maturation des globules rouges), le magnésium dans la chlorophylle, le cuivre dans l'hémocyanine (permettant le transport d'oxygène chez les invertébrés) ou encore le fer dans l'hémoglobine sont tous chélatés.

3.1.1 Constante de stabilité

Pour la réaction entre un métal et un ligand, $M + L \rightleftharpoons ML$, la constante de stabilité est définie par :

$$K_1 = [ML] / [M][L]$$

Si le métal peut encore complexer une autre molécule de ligand alors :



Finalement, on définit une constante cumulative de stabilité β_2 :

$$\beta_2 = K_1 \cdot K_2 = \frac{[ML_2]}{[M][L]^2}$$

On peut de façon plus générale, pour un métal pouvant chélater n ligands, définir une constante globale de stabilité : β_n

$$\beta_n = K_1 \cdot K_2 \cdot K_3 \cdot \dots \cdot K_n = \frac{[ML_n]}{[M][L]^n}$$

Les valeurs de ces constantes sont disponibles dans la littérature par leur logarithme. L'utilisation du logarithme est justifiée par le fait que $\log(K)$ est directement proportionnel à l'énergie libre de la liaison suivant la relation suivante : $\Delta G = -2,303.R.T.\log(K)$.

Cette constante mesure le degré d'association entre deux espèces à l'état d'équilibre. Quantitativement, plus la constante de stabilité est grande et plus l'association est forte.

3.1.2 L'interaction nickel-histidine

Parmi le large choix de ligands (imidazole, histidine, histamine, leucine, lysine, acide glutamique, asparagine, ...) et d'ions métalliques (Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II), Cd(II), Hg(II), Cu(II), Ag(I)) à disposition, nous avons choisi pour :

- chélateurs : l'histidine et l'imidazole (partie complexante de l'histidine) représentés sur la fig. 3.1
- chélate : l'ion nickel : Ni^{2+} , déjà chélaté en partie par un groupement NTA (Nitrilotriacétique acide)

L'interaction entre un ion nickel et deux histidines est présentée sur la figure 3.1.

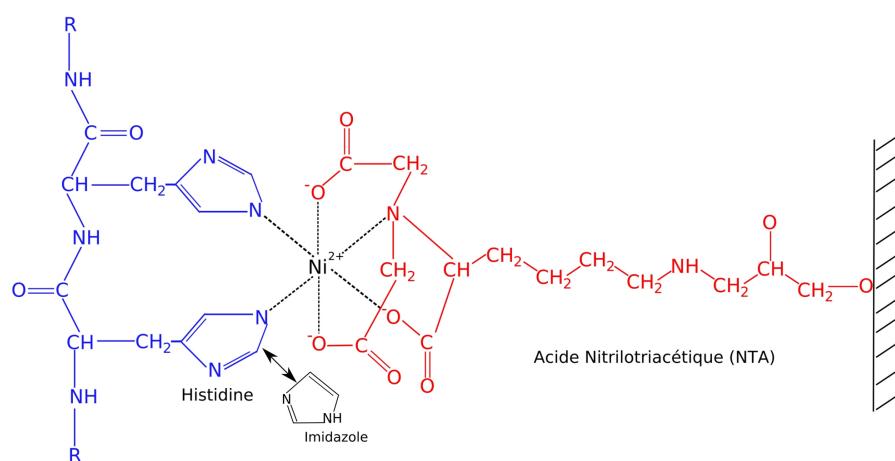


FIG. 3.1 – Chélation d'un ion nickel (Ni^{2+}) par deux histidines et un groupement NTA (Nitrilo Triacétique Acide). La petite molécule d'imidazole est la partie complexante de l'histidine. De part sa taille et sa mobilité, elle va entrer en compétition avec les histidines et déplacer l'équilibre de complexation.

Le tableau 3.1.2 présente les constantes de stabilité d'ordre 1 ainsi que la constante cumulative de stabilité pour deux histidines chélatant un ion nickel ainsi que les valeurs de la

constante de stabilité d'ordre 1 et de la constante cumulative de stabilité pour deux imidazoles chélatant un ion nickel.

Interaction	Référence	K_1	K_2	β_2
His-Ni	[R. M. C. Dawson et al., 1968]	$10^{8.9}$	10^7	$10^{15.9}$
His-Ni	[R. J. Sundberg and R. B. Martin, 1974]	$10^{8.7}$	$10^{6.9}$	$10^{15.6}$
Imi-Ni	[R. M. C. Dawson et al., 1968]	$10^{2.9}$	$10^{2.5}$	$10^{5.4}$
Imi-Ni	[R. J. Sundberg and R. B. Martin, 1974]	10^3	$10^{2.5}$	$10^{5.5}$

On peut comparer ces valeurs à des valeurs de constantes d'affinités pour des couples récepteurs-ligands souvent cités lors des processus d'adhésion. Le tableau suivant présente quelques constantes d'affinités :

Ligand	Récepteur	$K_a(M^{-1})$	Référence
L Selectin	Glycam-1	$\sim 10^4$	[M. K. Wild et al., 2001]
Icam-1	LFA-1	$\sim 10^6$	[Y. Tominaga et al., 1998]
Streptavidin	Biotin	$\sim 10^{15}$	[Miyamoto S. and Kollman P. A., 1993]

On constate que la constante de stabilité pour une chélation d'un ion nickel par deux histidines est du même ordre de grandeur que la constante d'affinité du couple streptavidine / biotine, la glue moléculaire des biologistes. On peut donc s'attendre à ce que notre interaction nickel-2 histidines soit robuste et stable.

3.1.3 Justification du choix de l'interaction

La chélation est couramment utilisée en biochimie depuis la fin des années 80 afin de purifier des protéines [Hochuli et al., 1987] sur des matrices NTA-Ni (Qiagen) ou pour immobiliser et orienter spécifiquement des protéines sur une surface [H. Noji et al., 1997], [Perret et al., 2002]. La purification de protéines his-tagguées nous indique que l'interaction Nickel - Histidine est stable, forte et avec une durée de vie importante. Des lipides fonctionnalisés avec du nickel ainsi que des billes chélatantes sont commercialement disponibles. Si on ajoute la possibilité de dessiner et de commander un peptide sur mesure, nous obtenons alors un système sur mesure facilement accessible. L'intérêt majeur de cette interaction est la possibilité de réguler la force d'interaction par l'ajout d'imidazole. L'imidazole, partie complexante de l'histidine, va permettre de modifier l'équilibre de complexation vers le relargage complet du nickel par les histidines. On peut aussi utiliser de l'EDTA, un dérivé du NTA qui va pouvoir attraper l'ion nickel. A l'aide de cette interaction, nous souhaitons observer des objets micrométriques recouverts de nickel en adhésion spécifique et forte sur un substrat fonctionnalisé avec des histidines. Par l'ajout d'imidazole en solution, nous voulons contrôler le nombre de liaisons adhésives et pouvoir passer d'une adhésion très forte caractérisée par aucun déplacement de l'objet sous flux à une adhésion plus faible où les objets présenteront toute une variété de mouvements à comparer avec les mouvements observés pour des objets biologiques en adhésion (globules blancs par exemple).

3.1.4 Spectroscopie de force de l'interaction Nickel-Histidine par AFM

De nombreux travaux traitant de la mesure de la force d'adhésion entre le nickel et l'histidine sont disponibles dans la littérature. La possibilité de dessiner et de purifier des protéines se terminant par un tag 6 histidines puis de les greffer sur une pointe d'AFM nous offrent de nouvelles voies dans l'étude des interactions moléculaires. Mais pour cela, il est nécessaire de connaître la force de rupture de l'interaction nickel-histidine.

Conti et coll [[M. Conti et al., 2000](#)]

Conti et coll ont réalisé les premières expériences de spectroscopie de force. Leur approche consiste à décorer une pointe d'AFM avec un peptide de 2 ou 6 histidines. La surface est recouverte de groupements Ni-NTA au bout d'un polysaccharide (Dextran). Ils obtiennent une large distribution de forces de rupture qui se situent respectivement à 350 et à 500 pN pour une vitesse de rétraction de 1 $\mu\text{m/s}$. La constante de raideur du cantilever étant comprise entre 60 et 120 pN/nm, le taux de charge est quant à lui compris entre 30 et 120 nN/s. Un contrôle en l'absence de nickel montre la disparition des ruptures ce qui permet de confirmer l'interprétation des ruptures observées comme étant la signature de l'interaction nickel-histidine.

Schmitt et coll [[L. Schmitt et al., 2000](#)]

Schmitt et coll greffent du dextran (500000 g/mol) sur une surface d'or et attachent ensuite de façon covalente un peptide constitué d'un tag 6 histidines. La pointe de l'AFM est décorée par des groupements NTA-thiol ainsi que par des groupements triéthylène-glycol-thiol (EO_3 -thiol) (1 :9, mol % mol %) afin de diminuer les interactions non spécifiques. Dans le but de déterminer les forces nécessaires pour casser une liaison par chélation, différents chélatants métalliques sont utilisés : Co^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} et Zn^{2+} . Ils obtiennent des distributions de forces dépendantes de l'ion métallique utilisé (de 22 à 58 pN). L'ajout d'EDTA inhibe l'interaction, ce qui démontre que leur résultat est bien la signature de l'interaction histidines - ions métalliques. Pour le couple qui nous intéresse, ils obtiennent une force de rupture de 38 pN pour une vitesse de rétraction de 0.5 $\mu\text{m/s}$. La constante de raideur du cantilever est de 60 pN/nm et le taux de charge de 30 nN/s.

Kienberger et coll [[Kienberger et al., 2000](#)]

Dans leurs travaux, Kienberger et coll utilisent 6 histidines greffées sur la pointe au bout d'un PEG. La surface d'or est décorée d'une monocouche de NTA. Le nickel est présent en solution. Lors de l'ajout en solution d'imidazole, la probabilité d'attachement diminue vers 5 %. En utilisant différents taux de charges et ils constatent que l'évolution de la force de rupture, comprise entre 150 et 200 pN, est linéaire avec le taux de charge. Sachant que le le taux de charge vaut 4.5, 43 et 70 pN/s, Ils en déduisent des temps de vie pour les différentes forces appliquées et ils ajustent leurs données expérimentales par une loi de type Bell (le temps de vie de la liaison décroît exponentiellement avec la force appliquée). Ils en déduisent une durée de vie de l'absence de forces extérieures de 15 s et une longueur de lien effective

Référence	Nombre d'histidines	Espaceur	Greffage de l'histidine	Taux de charge	Temps de vie (ms)	Force de rupture (pN)
(a)	6	dextran 500000	surface	30 nN/s	?	38
(b)	2	dextran	pointe	60 120 nN/s	?	350
	6					500
(c)	6	PEG 18 unités	pointe	4.5, 43 et 70 nN/s	17, 2.5 et 2.2	150, 188 et 194

TAB. 3.1 – Tableau résumant les différents travaux sur la spectroscopie de force par AFM de la chélation du nickel par des histidines. (a) : [L. Schmitt et al., 2000], (b) : [M. Conti et al., 2000], (c) : [Kienberger et al., 2000].

de 0,19 nm.

Le tableau 3.1 résume les différents résultats.

Mesures par Lévy [Raphaël Lévy, 2002]

Lévy a aussi fait des expériences d'AFM avec le couple Ni-Histidine. Pour cela, il utilise des lamelles fournies par Qiagen sur lesquelles se trouvent des groupements NTA-Ni. La pointe, quant à elle, est décorée de polyhistidine. Il obtient une force de rupture de 240 pN en moyenne, et ce quelle que soit la vitesse de rétraction (1, 0.5 et 0.2 $\mu\text{m/s}$, soit 32, 16 et 6.4 nN/s). Afin de s'assurer de la spécificité des forces qu'il sonde, il utilise ensuite de l'imidazole.

Un des résultats inattendus de ce travail réside dans l'évolution de force qui augmente lorsque la vitesse de rétraction est plus faible. Ce résultat est en contradiction avec la théorie d'Evans. Il explique cela par le fait qu'en allant plus doucement, on augmente les possibilités de reformation des liens. On peut aussi observer que les autres auteurs se placent à chaque fois dans un environnement dilué en histidine afin de s'approcher de la molécule unique. Lévy, au contraire, du fait qu'il utilise de la polyhistidine adsorbée sur la pointe, est dans un régime dense en liens.

On constate des résultats assez variés dans les valeurs des forces de rupture. Un point important est qu'un peptide se terminant par 6 histidines nécessite l'application d'une plus grande force pour casser les liaisons qu'un peptide se terminant par 2 histidines. En effet, la présence de 6 histidines augmente la probabilité de rattachement des histidines au nickel.

3.2 A propos des vésicules

Nous souhaitons mettre en mouvement sous écoulement dans un état d'adhésion des objets micrométriques. Pour cela, nous avons choisi des vésicules lipidiques géantes unilamellaires et des billes d'agarose portant des groupements nickel en surface. En effet, les vésicules présentent la particularité d'être des objets simples, pouvant mimer la membrane

cellulaire. Comme nous allons le voir, les propriétés de cet objet peuvent de plus être modulées. Les billes sont plus rigides que des vésicules et donc beaucoup moins déformables. De plus, aucun récepteur ne peut diffuser sur sa surface, contrairement aux vésicules. On détaille ci-après les propriétés des vésicules.

Une vésicule lipidique est par définition une petite sphère creuse qui s'apparente à un sac de taille microscopique (vésicule vient du latin *vesicula* signifiant vessie ou poche). La membrane de ces sacs est une bicouche phospholipidique. Cette structuration est due à la dualité des molécules de phospholipides. En effet, elles sont constituées d'une tête polaire hydrophile (groupement phosphate généralement) et d'une queue apolaire formée d'une ou deux chaînes hydrocarbonées de longueur variable (de 14 à 24 atomes de carbone avec doubles liaisons possibles). Ainsi, les phospholipides mis en contact avec de l'eau vont s'aligner les uns par rapport aux autres pour former deux feuillets bidimensionnels accolés de 6 nm d'épaisseur. Les queues hydrophobes se trouvent ainsi protégées des molécules d'eau par les têtes hydrophiles (Fig. 3.2). Les molécules de lipides occupent une aire par molécule de l'ordre de 0.4 nm^2 [R. Lipowsky and E. Sackmann, 1995], avec une distance de 0.5 nm entre les molécules. Ce faible encombrement confère un grand nombre de lipides à une vésicule. Ainsi, une vésicule de $10 \mu\text{m}$ de rayon est constituée de 10^9 lipides.

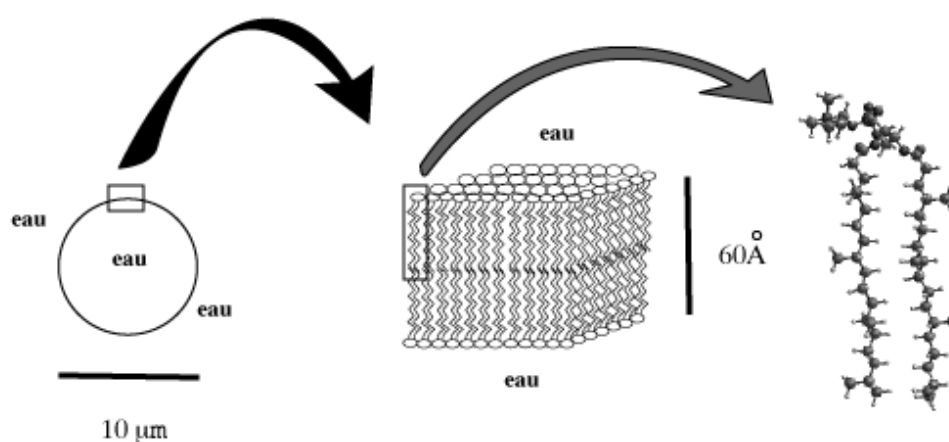


FIG. 3.2 – Une vésicule est constituée d'une bicouche phospholipidique (deux feuillets). Les phospholipides ont une tête hydrophile polaire et une double queue hydrocarbonée apolaire. Son épaisseur totale est de 5 à 7 nm. La molécule représentée ici est la diphytanoyl-phosphatidylcholine, un phospholipide que l'on trouve dans le jaune d'oeuf.

Les tailles typiques des vésicules s'étalent sur différents ordres de grandeurs. Nous pouvons les classer suivant les trois catégories de tailles suivantes :

- de 20 à 100 nm, on parle de petites vésicules unilamellaires ou S.U.V (Small Unilamellar Vesicles)
- de 100 à 500 nm, on parle de grandes vésicules unilamellaires ou L.U.V (Large Unilamellar Vesicles)

- et de 0.5 à 100 μm , on parle de vésicules unilamellaires géantes ou G.U.V (Giant Unilamellar Vesicles)

Mais les vésicules ne sont pas toujours unilamellaires, elles peuvent être multilamellaires à plusieurs bicouches (on les nomme M.L.V : Multi Lamellar Vesicles) ou encapsulant d'autres vésicules.

3.2.1 Propriétés des vésicules : la fluidité de la membrane.

En fonction de la température et de la nature des lipides utilisés, les bicouches lipidiques présentent une phase gel ou une phase fluide (fig. 3.3). Par exemple, une vésicule constituée de DMPC (Dimyristoylphosphatidylcholine) a une transition de phase pour une température critique $T_C = 23,4^\circ\text{C}$: pour une température $T > T_C$, la vésicule est fluide et pour $T < T_C$, la vésicule est dans une phase gel.

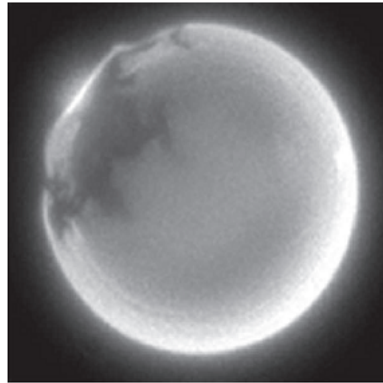


FIG. 3.3 – Image d'une vésicule contenant deux phases : une phase gel (phase sombre), et une phase fluide (phase fluorescente). La composition de la vésicule est en masse de 50 % de Sphingomyeline et de 50 % de DOPC (d'après [Jacques Pécreaux, 2004]).

Pour une bicouche lipidique en phase fluide, il a été estimé que le temps moyen pour qu'une molécule fasse le tour d'une vésicule de quelques micromètres de diamètre est de l'ordre d'une seconde (typiquement un lipide explore une zone de $10\ \mu\text{m}^2$ en 1s). Les coefficients de diffusion des lipides au sein de la bicouche sont de l'ordre de 1 à $10\ \mu\text{m}^2/\text{s}$. En phase gel, le coefficient de diffusion est de l'ordre de 10^{-8} à $10^{-5}\ \mu\text{m}^2/\text{s}$. Comme il est possible d'insérer des protéines et des molécules d'intérêts pour l'adhésion, la fluidité de la membrane va jouer un rôle dans le recrutement des molécules sur des sites adhésifs ([Brochard-Wyart and de Gennes, 2002]).

Il est à noter qu'outre la fluidité de la membrane, les propriétés mécaniques (élasticité, rigidité) de la vésicule se trouvent grandement modifiées lorsque qu'elle passe d'une phase gel à une phase fluide.

3.2.2 Propriétés des vésicules : perméabilité et taux de dégonflement.

La présence d'un gradient de concentration entre l'intérieur et l'extérieur de la vésicule, va permettre l'échange de molécules à travers la membrane. Les molécules peuvent diffuser plus ou moins facilement à travers la membrane. Les petites molécules hydrophobes (comme O_2 ou CO_2), ou neutres (comme l'eau, l'urée, le glycérol) traversent la bicouche avec un coefficient de perméabilité élevé (entre 10^{-2} et 10^{-5} cm/s). Les ions portant une charge nette vont être entourés d'eau et vont donc avoir plus de difficulté, tout comme les grosses molécules, à passer à travers la membrane. Ils présentent donc des coefficients de perméabilité faibles.

A partir de cette considération de perméabilité, nous pouvons introduire la notion de taux de dégonflement. En effet, si des grosses molécules (comme le sucrose ou le glucose) ne peuvent traverser la membrane, elles vont alors exercer une pression osmotique Π sur la membrane, qui ne dépend que des concentrations respectives des molécules (au premier ordre) :

$$\Pi = RT \ln\left(\frac{C_{\text{int}}}{C_{\text{ext}}}\right) \quad (3.1)$$

avec R , la constante universelle des gaz, T la température et C_{int} et C_{ext} les concentrations des espèces à l'intérieur et à l'extérieur de la membrane.

A l'équilibre, les potentiels chimiques de chaque espèce vont s'équilibrer. Pour cela, de l'eau va alors diffuser à travers la membrane. Si la concentration externe est supérieure à la concentration interne, alors la vésicule va ouvrir des pores et de l'eau va sortir de la vésicule qui se dégonfle (figure 3.4). Par contre, si c'est la concentration interne qui est supérieure à la concentration externe, de l'eau va diffuser à l'intérieur de la vésicule qui va se gonfler jusqu'à prendre une forme très sphérique. Elle peut même exploser si le gradient de concentration est trop important.

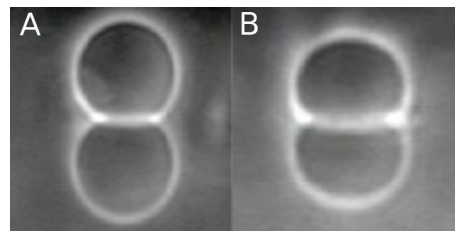


FIG. 3.4 – A : Vésicule sphérique de rayon $R=21 \mu\text{m}$. B : vésicule dégonflée présentant un taux de dégonflement ν de 0.95.

Afin de rendre compte des différentes formes que peuvent prendre des bicouches lipidiques à l'équilibre selon leur gonflement, on peut définir le taux de dégonflement ν :

$$\nu = \frac{V}{\frac{4}{3}\pi\left(\frac{A}{4\pi}\right)^{\frac{3}{2}}} \quad (3.2)$$

où V est le volume de la vésicule et A son aire. Ce rapport vaut 1 pour une sphère.

3.2.3 Propriétés mécaniques des vésicules : énergie de courbure

En 1973, Helfrich [Helfrich, 1973] développa une théorie sur l'énergie de courbure d'une bicouche bidimensionnelle. En effet, pour une vésicule, contrairement aux gouttes, la tension n'est pas importante et seule l'énergie de courbure compte. L'énergie libre de la bicouche par unité de surface E_{Helfrich} , contient un terme de courbure et un terme topologique :

$$E_{\text{Helfrich}} = \frac{1}{2} \chi (C_1 + C_2 - C_0)^2 + \chi' (C_1 \cdot C_2) \quad (3.3)$$

où le terme $C_1 + C_2$ représente la courbure moyenne (C_1 et C_2 sont les inverses des rayons de courbure), C_0 est un terme de courbure spontanée existant uniquement si la bicouche est asymétrique, χ est le module de courbure qui vaut environ 10 à 20 kT, χ' est un module de courbure gaussienne et le terme $C_1 \cdot C_2$ est la courbure gaussienne dépendant de la topologie de la bicouche. En effet, le théorème de Gauss Bonnet donne la relation suivante pour l'intégrale d'une surface fermée :

$$\int_S dS C_1 C_2 = 4\pi(1 - n_{\text{trou}}) \quad (3.4)$$

avec n_{trou} , le nombre de trous se trouvant dans la surface fermée. Pour une vésicule, ce terme vaut simplement 4π .

3.2.4 Propriétés mécaniques des vésicules : extension-compression ("*stretching*")

Le module d'extension est une mesure de l'énergie nécessaire afin d'augmenter l'aire de la membrane lipidique et caractérise la cohésion des lipides entre eux. Cette énergie est donnée par l'équation 3.5 :

$$E_{\text{Stretching}} = \frac{1}{2} \chi \left(\frac{\Delta A}{A} \right)^2 \quad (3.5)$$

où χ est le module de compressibilité de la bicouche, et $\frac{\Delta A}{A} = \frac{A - A_0}{A}$ est la variation d'aire relative de la membrane lors de sa déformation à partir d'une aire initiale A_0 .

3.2.5 Propriétés mécaniques des vésicules : fluctuation de la membrane

Pour des bicouches en phase fluide, le faible module élastique de courbure (quelques kT) rend les vésicules très déformables. Les vésicules présentent des fluctuations thermiques de leurs membranes à toutes les échelles de tailles, ces fluctuations pouvant être observées en microscopie optique [Sandre, 2000].

Chapitre 4

Elaboration du système expérimental

Dans ce chapitre, nous allons nous intéresser aux matériels et aux protocoles utilisés pour réaliser des vésicules par la méthode d'électroformation et fonctionnaliser une surface.

4.1 Lipides employés et fabrication des vésicules-nickel.

Nous avons utilisé les lipides suivants dans la composition de nos vésicules :

- **DOPC** : 1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-phosphatidylcholine acheté chez Avanti Polar Lipids. Sa structure est présentée sur la fig. 4.1.

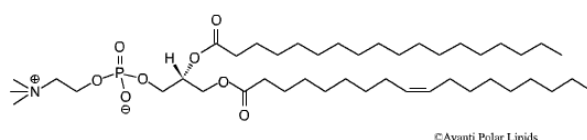


FIG. 4.1 – DOPC : 1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-phosphatidylcholine

- **DOGS-NTA Nickel salt** : 1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3[N-(5-amino-1-carboxypentyl) iminodiacetic acid succinyl] (Fig. 4.2) acheté chez Avanti Polar Lipids.

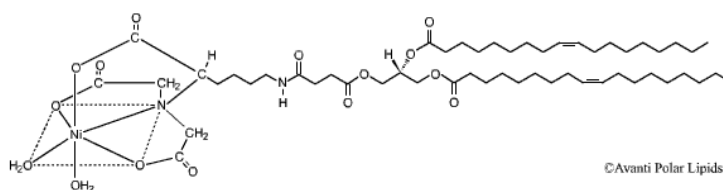


FIG. 4.2 – DOGS-NTA-Ni : 1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3[N-(5-amino-1-carboxypentyl) iminodiacetic acid succinyl]

Ces lipides sont achetés en poudre afin d'être dans un premier temps dilués dans une solution de chloroforme/méthanol (9 :1) pour obtenir une solution mère à une concentration de 10 mg/mL. A partir de cette solution mère, des solutions filles sont préparées à une concentration de 2 mg/mL. Les vésicules sont préparées à partir de la méthode classique d'électroformation initiée par Angelova [[Angelova et al., 1992](#)].

Cette méthode consiste à l'hydratation sous champ électrique alternatif d'un film de lipides déposé sur une plaque d'ITO. Une chambre d'électroformation est alors formée par la mise en regard de deux plaques d'ITO. Les lipides sont habituellement hydratés par une solution de sucre dont on choisit l'osmolarité.

Nous choisissons le sucre pour deux raisons : le sucre étant plus dense que le glucose, des vésicules remplies d'une solution de sucre plongées dans une solution de glucose vont sédimenter. De plus, le sucre présente un indice optique différent du glucose et ainsi des vésicules remplies de sucre et plongées dans du glucose vont pouvoir être observées par microscopie à contraste de phase (figure 4.3).

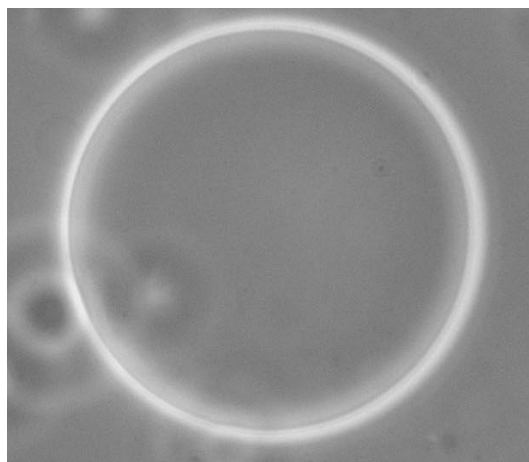


FIG. 4.3 – Vésicule remplie d’une solution de sucrose baignant dans une solution de glucose, vue en contraste de phase. Son diamètre est de $77\ \mu\text{m}$.

La tête polaire des lipides NTA-Ni dépasse de $0.5\ \text{nm}$ [Puech, 2003] des lipides DOPC. Nous avons utilisé des concentrations en lipides nickel de 5, 10, 15 et 25 %. A chaque fois nous avons réussi à électroformer des vésicules.

4.2 Les billes d’agarose chélatantes

Outre des vésicules comportant des têtes nickel, nous avons aussi à notre disposition des objets rigides, sans fluidité de membrane et présentant des têtes nickel à leur surface : des billes d’agarose.

Ces billes d’agarose sont faites d’un gel d’agarose (réticulée à 6%).

Comme précédemment cité, ces billes sont couramment utilisées dans la purification de protéines his-tagées. Ces billes ont été observées par différentes techniques de microscopie. La figure 4.4 montre une bille vue par ces techniques.

On a caractérisé les billes d’agarose en mesurant leur distribution de taille et leur densité. Les billes présentent une taille polydisperse. La distribution de taille présentée sur la figure 4.5a été obtenue par la mesure de la taille sur une population de 1065 billes. La distribution de taille est centrée sur un rayon de $32\ \mu\text{m}$ avec une largeur à mi-hauteur de $\pm 10\ \mu\text{m}$.

La densité des billes a été mesurée à l’aide du microscope couché. Il suffit de mesurer la vitesse de sédimentation de billes loin d’une paroi pour pouvoir estimer leur densité. En effet, la différence de masse volumique, $\Delta\rho$, entre l’objet et le fluide est donnée par la relation suivante :

$$\Delta\rho g \frac{4}{3}\pi R^3 = 6\pi\eta Rv \quad (4.1)$$

où R est le rayon des billes, v la vitesse de sédimentation et g est l’accélération de la pesanteur. Les billes ont été plongées dans une solution contenant du glucose à une concentration de $350\ \text{mM}$. La valeur de la masse volumique d’une telle solution de glucose est tabulée et vaut $1022,1\ \text{kg/m}^3$. Les mesures de la vitesse sur des billes dont les rayons varient de 17 à

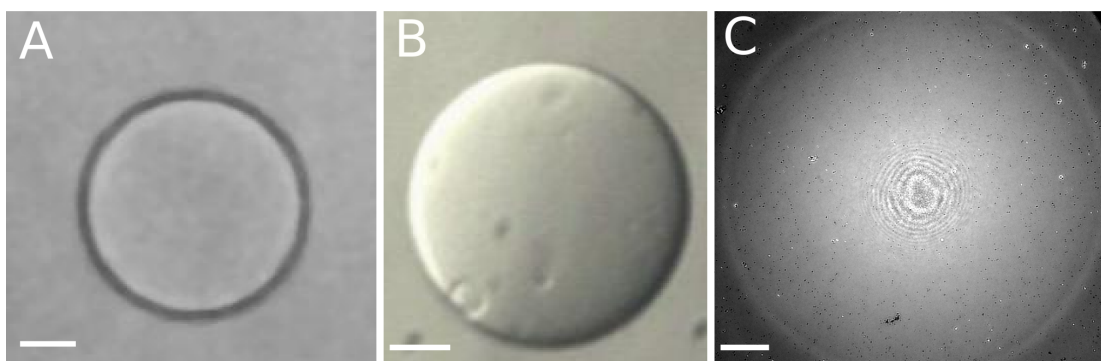


FIG. 4.4 – A : Vue en champ clair d’une bille. La barre représente 30 microns. B : Vue en DIC d’une bille. La barre représente 30 microns. C : Vue en RICM d’une bille. La barre représente 10 microns.

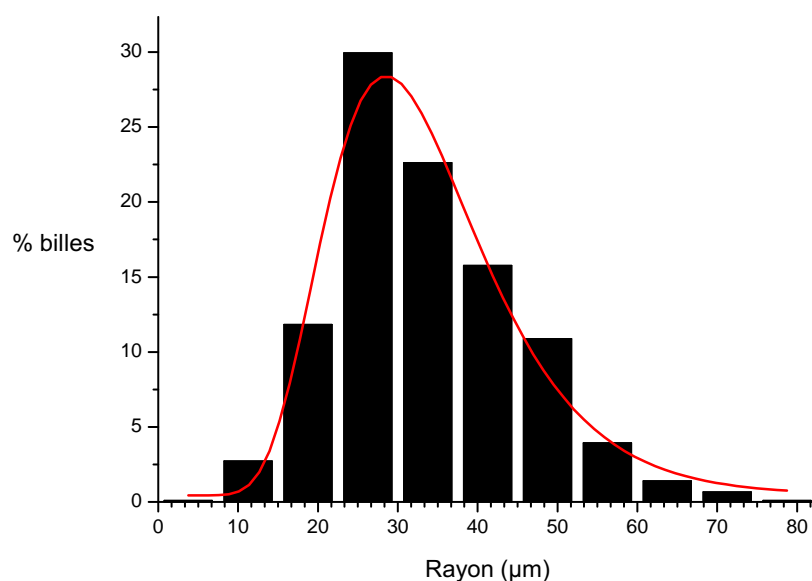


FIG. 4.5 – Distribution de taille des billes d’agarose recouvertes de nickel déterminée à partir de la mesure du diamètre de 1065 billes. On a reporté le pourcentage de billes présentant un rayon donné en fonction du rayon mesuré. La courbe rouge est un ajustement de la distribution par une loi log-normale.

58 μm , ont permis d’obtenir une différence de masse volumique de 46.6 kg/m^3 . Ainsi, la densité de ces billes d’agarose est de 1.0466.

4.3 Réalisation des surfaces

4.3.1 Les peptides utilisés

Nous greffons sur la surface le peptide AV20KH dont la séquence est : KGGSGGSYGGSGGSHHHHHH, où K correspond à la lysine, G la Glycine, S la Sérine, Y la tyrosine, et H l'histidine. La lysine se trouve en premier car elle comporte un groupement amine (NH_2) réactif. Ce peptide, synthétisé par Covalab, présente les caractéristiques suivantes :

- Longueur de la séquence : 20 acides aminés
- Masse moléculaire : 1936,95 g/mol
- Coefficient d'extinction molaire à 280 nm (1cm) : 1280
- Absorption 0,1 % (1 g/L) à 280 nm (1 cm) : 0.661
- Point isoélectrique théorique : 9,84
- Index aliphatique : 0,00

Nous avons aussi travaillé avec de l'histidine GFP (Green Fluorescence Protein) purifiée suivant le protocole présenté en annexe [A](#).

4.3.2 Les différents protocoles de greffage

Au cours de la thèse, nous avons varié le protocole de greffage du peptide afin de répondre à certains problèmes. Nous allons présenter ces différents protocoles et expliciter les résultats obtenus avec. Le protocole suivant présente la méthode adoptée afin d'obtenir des lamelles de verre présentant des histidines en surface. Toutes les réactions chimiques sont présentées sur la figure : [4.6](#)

Protocole 1

Pré-activation des surfaces de verre

Nos lamelles en verre sont d'abord préactivées avec un silane afin de présenter en surface un groupement amine, grâce aux étapes suivantes :

- on dégraisse les lamelles au détergent avant de les laver à l'éthanol.
- on les incube sous agitation pendant 5 min dans une solution de soude à 14.5 M, afin d'obtenir des groupements hydroxyle à la surface, groupements hydroxyle permettant de greffer la couche fonctionnelle de silane. Afin de préparer une solution de soude à 14.5M, nous diluons dans 100mL d'eau distillée, 58g de soude. Cette dissolution étant très exothermique, elle est effectuée dans un bain de glace.
- on rince les lamelles à l'eau distillée dans un bain sous agitation puis à la pissette .
- on incube les lamelles pendant 20 min dans une solution de γ -APS (5 mM d'acide acétique et 1% de γ -aminopropyltriéthoxysilane). Pour cela, on dilue 25 μL d'acide acétique et 870 μL de silane dans 87 mL d'eau . Cette incubation se fait sous agitation et sous hotte aspirante.
- comme précédemment, on rince les lamelles à l'eau distillée dans un bain sous agitation puis à la pissette .

- les lamelles sont séchées à la soufflette puis recuites pendant 15 min à 100 °C afin de solidifier le polymère et de le rendre mécaniquement plus stable en supprimant les liaisons hydrogènes.

Greffage du peptide

Maintenant que nos surfaces de verre sont réactives, nous pouvons greffer le peptide en suivant ce protocole :

- les lamelles sont incubées dans du glutaraldéhyde à 10 % pendant 1h30 sous agitation et sous hotte aspirante. Le glutaraldéhyde va permettre de ponter l'amine du silane avec l'amine du peptide mais il peut aussi ponter deux silanes entre eux.
- les lamelles sont une nouvelle fois rincées à l'eau distillée sous agitation puis à la pissette.
- le peptide est dilué à une concentration de 0.15 à 0.3 mg/mL dans un tampon de carbonate-bicarbonate à une concentration de 0.2 M et à un pH = 8. Le tampon est préparé de la façon suivante : on prélève 47.35 mL d'une solution de Na_2HPO_4 à 0.2 M et 2.65 mL d'une solution de NaH_2PO_4 aussi à 0.2 M. Ensuite, on complète le tout jusqu'à 100 mL par l'ajout de 50 mL d'eau. On choisit un pH de 8 afin de diminuer les charges sur le peptide, et donc de favoriser sa réaction avec la surface car le peptide présente un point isoélectrique à un pH = 9¹.
- on recouvre nos lamelles de peptide puis on laisse incuber pendant 2 heures à 37 °C sans agitation dans une chambre humide afin de prévenir l'évaporation du peptide.
- on rince les lamelles avec une solution de PBS-Triton préparée à partir de 90 mL de PBS(x10) et 0.9 mL de Triton X-100 pur.
- afin de passiver la surface, les lamelles sont incubées pendant 1 heure dans une solution d'éthanolamine à 0.2 M et à un pH = 10 (le point isoélectrique de l'éthanolamine est pour un pH = 10) à 37 °C sous agitation. La solution d'éthanolamine est préparée en diluant 1.22 g d'éthanolamine dans 100 mL d'eau. Le pH est ajusté par l'ajout d'acide chlorhydrique (HCl).

Enfin, les lamelles sont conservées dans une solution d'azoture de sodium préparée par la dilution de 0.9 mL d'azide à 10 % dans 90 mL de PBS(10x) (l'azoture de sodium est un puissant bactéricide).

La préparation du peptide à une concentration avoisinant les 0.3 mg/mL requiert la pesée de 0.6 mg de peptide à diluer dans 2 mL. Une si faible quantité à peser peut générer une grande dispersion de la concentration attendue. Pour connaître la concentration réelle du peptide, nous avons recours à la spectrophotométrie. Ainsi, avant l'incubation des lamelles avec le peptide à 37 °C, nous déposons la solution dans la cuve d'un spectrophotomètre. Sachant que 1mg/mL de peptide présente une D.O (Densité Optique) de 0.661 à 277 nm, nous effectuons un scan de 250 nm à 310 nm. La valeur du pic à 277 nm va nous permettre d'obtenir la valeur exacte de la concentration de peptide utilisée .

¹le point isoélectrique correspond à une valeur de pH pour laquelle le peptide n'est pas chargé

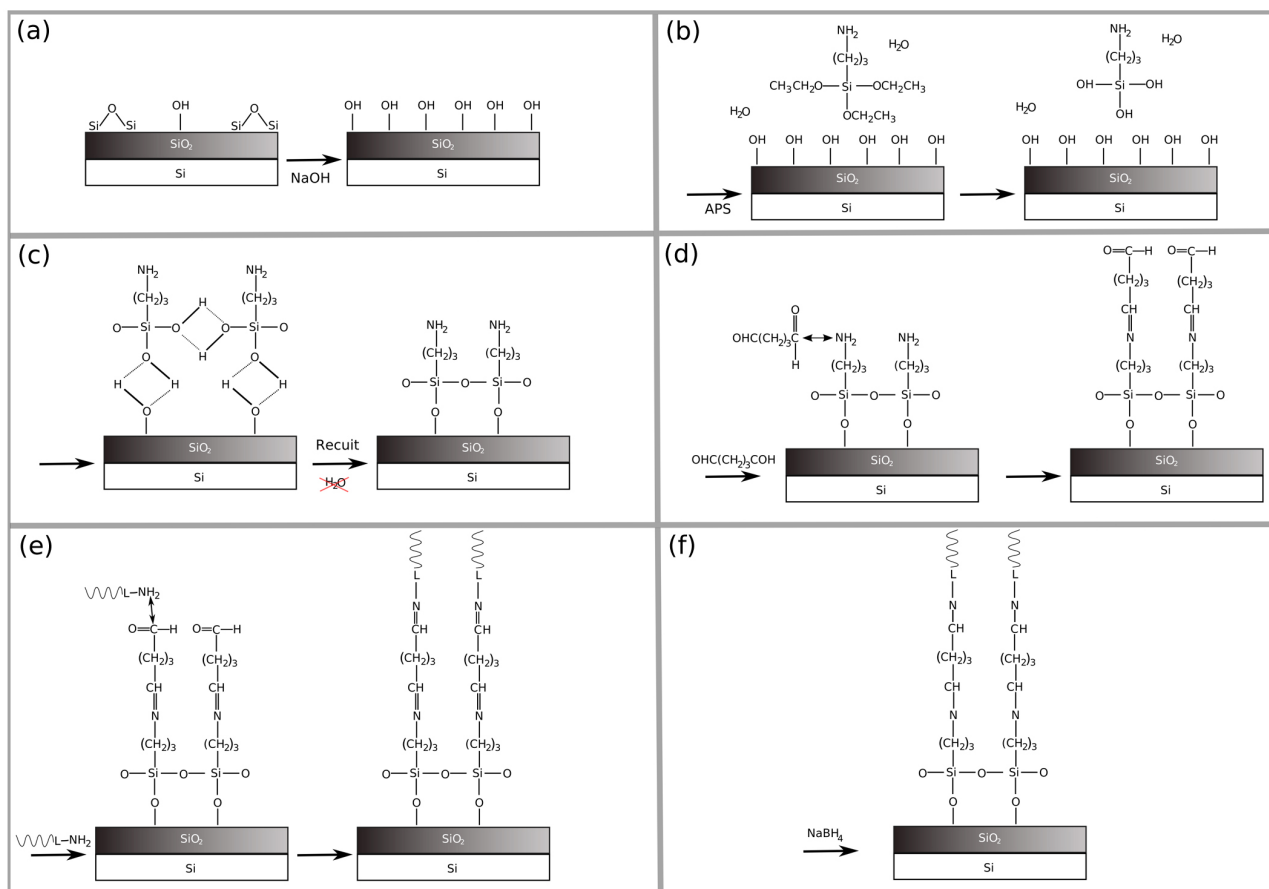


FIG. 4.6 – Greffage de notre peptide. (a) : hydroxylation du verre par de la soude afin d'obtenir des groupements Si-O-Si. (b) :Greffage du γ APS sur du verre préalablement hydroxylé. (c) : recuit afin de supprimer les liaisons hydrogènes et de solidifier le polymère. (d) : ajout du glutaraldéhyde afin de ponter deux amines entre elles. (e) : incubation du peptide qui réagit via son amine. (f) : ajout du NaBH_4 , pour stabiliser le polymère (protocole 2 et protocole final).

Avec ce protocole, on a testé le comportement sous écoulement de vésicules et on a observé :

- des vésicules sphériques composées de 10 et de 20 % de lipides nickel présentant des régimes d'adhésion (déplacements à vitesses non constantes, arrêts transitoires). Ces vésicules ne représentent que 5 à 10 % des vésicules observées.
- des vésicules sphériques composées de 20 % de lipides nickel, qui lors de l'ajout d'imidazole en solution, s'accrochaient toutes en exhibant des formes de demi-gouttes. Le lavage de ces vésicules par du glucose permettait de les décrocher.

Comme le pourcentage de vésicules présentant de l'adhésion sous écoulement est faible, on a décidé d'augmenter la concentration de peptide incubé. De plus, l'ajout d'imidazole en solution donnant des résultats anormal, on s'est demandé si l'éthanolamine ne se désorbée pas de la surface et que l'imidazole prenait sa place. On a alors décidé d'incubée la lamelle

avant une expérience dans de l'éthanolamine. Ces nouveaux processus, ont donc conduit à l'utilisation du protocole 2

Protocole 2

Pour ce deuxième protocole, l'étape de pré-activation reste inchangée. La concentration de peptide incubé a été augmentée à 1.2 mg/mL. Enfin, avant chaque expérience la lamelle a été incubée dans de l'éthanolamine.

Avec ce protocole, on a observé :

- des vésicules sphériques composées de DOPC adhérant peu sur la surface
- des vésicules sphériques composées de 5 % de lipides nickel présentant des régimes d'adhésion. La proportion de vésicules adhérees est de 5 %.

Les résultats n'étant pas satisfaisant en terme de statistique du nombre de vésicules en état d'adhésion, on s'est demandé si le peptide ne se détacherait pas de la surface. En effet, la liaison entre le peptide et le glutaraldéhyde est une double liaison qui peut être réversible. Afin de remédier à cela, nous avons ajouté une étape de stabilisation du peptide au protocole 2.

Protocole final

Après l'incubation des lamelles dans l'éthanolamine, on effectue les étapes suivantes.

- les lamelles sont à nouveau rincées dans une solution de PBS-Triton.
- enfin nous stabilisons le polymère par incubation des lamelles dans une solution de borohydrure de sodium (NaBH_4) à 3.5 mg/mL sans agitation et à température ambiante pendant 1 heure. Les lamelles sont encore rincées avec la solution de PBS-Triton . Cette étape permet de transformer toutes les doubles liaisons réversibles (imine instable) en simples liaisons irréversibles (amine stable).

Sur des surfaces réalisées suivant le protocole final, des vésicules composées à 100 % de DOPC et des vésicules composées à 95 % de DOPC et 5 % de lipides nickel ont été déposées. Dans les deux cas, les vésicules adhéraient toutes sur la surface (ces expériences furent menées avec une solution externe, dans laquelle les vésicules sont diluées, composée de glucose, à même osmolarité que le sucrose des vésicules, ou d'un mélange de glucose et de NaCl (50 mM)). Enfin, des billes de nickel ont été déposées sur ces surfaces. Ces billes se décrochent toutes sous l'effet de l'imidazole et présentent des mouvements en adhésion prouvant que la surface est bien greffée en histidine et prouvant la spécificité de l'adhésion. Ce protocole rajoute des interactions non-spécifique entraînant donc une forte adhésion des vésicules. Par contre, sur des billes d'agore recouvertes de nickel, la spécificité de l'interaction est démontrée.

On a alors abandonné l'idée de faire une série d'expériences exhaustives sur les vésicules et on a décidé de faire des expériences sur les billes chélatantes en utilisant le protocole final.

Chapitre 5

Caractérisation des surfaces et des objets

Dans ce chapitre, nous allons présenter les méthodes de caractérisations que nous avons utilisés pour caractériser des surfaces et des objets micrométriques. Pour caractériser les surfaces, on a utilisé une méthode basée sur la mesure de fluctuations de fluorescences et de la microscopie confocale. Les objets micrométriques (vésicules et billes) ont été caractérisé par des mesures de fluorescence.

5.1 Caractérisation des surfaces par Spectroscopie à corrélation de fluorescence (FCS)

Afin de caractériser nos surfaces fonctionnalisées avec des histidines, on a choisit une méthode qui n'était pas encore utilisée de manière courante. Ainsi dans le cadre d'une collaboration, on disposait de leur montage expérimental qu'ils étaient en train de développer. Dans un premier temps, on va expliciter la théorie, pour ensuite parler en détail du dispositif expérimental, de sa mise au point et de son amélioration. Enfin, nous montrerons les premières tendances et nous finirons par une discussion.

5.1.1 Principe général de la FCS

La spectroscopie à corrélation de fluorescence (FCS) est une technique basée sur l'étude des fluctuations spontanées de fluorescence d'un petit ensemble de molécules qui sont excitées par un laser et observées dans le volume confocal d'observation d'un microscope (pouvant être de l'ordre du femtolitre). Par différents processus, le signal de fluorescence issu de ce volume, que l'on note $F(t)$, va fluctuer au cours du temps. A partir de ces fluctuations, on peut calculer la fonction d'autocorrélation $G(\tau)$ du signal de fluorescence (figure : 5.1). Nous définissons les fluctuations du signal de fluorescence par :

$$\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle \quad (5.1)$$

où $\langle \rangle$ représente une moyenne temporelle. La fonction d'autocorrélation du signal de fluorescence est alors [Webb, 2001] :

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (5.2)$$

A partir de l'analyse des fluctuations et donc de la fonction d'autocorrélation on peut :

- obtenir des informations sur la cinématique des molécules fluorescentes (diffusion et taille des molécules, processus photochimiques, interactions moléculaires [Laure Wawrezynieck, 2006], [P. Schwille and E. Haustein, 2004]).
- déduire le nombre moyen de molécules présentes dans le volume confocal (par exemple, peu de fluctuations de fluorescence va correspondre à un nombre important de molécules alors que de grandes fluctuations indique la présence de peu de molécules).

Les mesures doivent être réalisées à de faibles concentrations de molécules (de l'ordre du nanomolaire), dans des condition d'équilibre thermodynamique local avec de très bonnes résolutions temporelles (mesure de temps de diffusion de l'ordre de la dizaine μs) et spatiales (inférieure au μm^3).

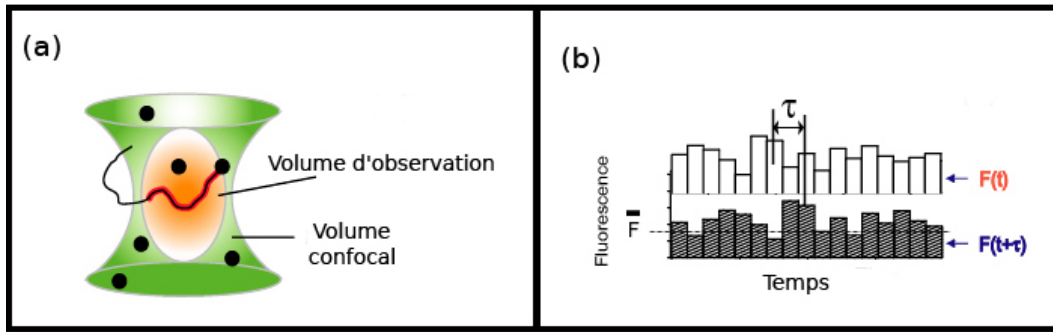


FIG. 5.1 – (a) : Volume confocal d'observation (en rose) dans lequel des particules (ronds noirs) sont illuminées par le faisceau laser (en vert). Le volume d'observation est la région de l'espace dans laquelle les molécules fluorescentes sont à la fois excitées et détectées. (b) : Le signal $F(t)$ à un temps t est corrélé avec lui-même à un temps $t+\tau$ afin de calculer l'autocorrélation des fluctuations de fluorescence $G(\tau)$.

5.1.2 Calcul du nombre moyen de molécules grâce à la fonction d'autocorrélation

L'analyse de $G(\tau)$, doit permettre la connaissance du nombre de molécules fluorescentes présentes dans le volume illuminé, ce qui doit nous permettre de remonter à une concentration absolue des molécules greffées sur la surface d'un échantillon.

En solution, les fluctuations de fluorescences sont dues aux molécules qui rentrent et qui sortent du volume confocal par diffusion. Or nous sommes intéressés par la densité et la répartition locale de molécules greffées sur une surface solide (typiquement une lamelle de verre). Dans cette configuration, les molécules sont privées de tout déplacement. Nous allons donc leur imposer, grâce à un piézoélectrique, un mouvement en faisant bouger la surface par rapport au faisceau laser [Delon et al., 2006], [Derouard et al., 2006] à une vitesse V imposée (de l'ordre de $10\mu\text{m.s}^{-1}$). Ce système de déplacement permet des balayages micrométriques et reproductibles de la surface. Dans ce contexte, la MDE (pour *Molecular Detection Efficiency*, qui décrit l'efficacité de détection de la fluorescence dans le plan du substrat par

notre système, peut être approchée par une gaussienne : $W(\vec{r}) = \exp\left(-\frac{2r^2}{\omega_0^2}\right)$ où ω_0 est le rayon de la surface de la lamelle interceptant le volume confocal. La taille et la forme du faisceau laser focalisé sur la surface influence énormément la valeur de ω_0 .

Dans ce genre de situation, la fonction d'autocorrélation présente un plateau de durée $\tau_c = \omega_0/V$ qui représente le temps de déplacement de la surface par rapport au faisceau laser sur une distance égale à ω_0 (de l'ordre de $0.2\mu\text{m}$). Il a été montré que la fonction d'autocorrélation est alors une gaussienne [Magde et al., 1978] :

$$G(\tau) = 1 + [G(0) - 1] \cdot \exp^{-(\tau/\tau_c)^2} \quad (5.3)$$

On montre que le nombre moyen de molécules $\langle N \rangle$, défini par : $\langle N \rangle = C \int W(\vec{r}) d^2r$ avec C la densité locale de molécules fluorescentes sur le substrat, est directement relié à l'amplitude de la fonction d'autocorrélation $G(0)$ selon l'équation 5.4.

$$\langle N \rangle = \frac{\gamma_2}{G(0) - 1} \quad (5.4)$$

où γ_2 est un facteur géométrique valant 0.5 pour une MDE gaussienne.

Etant donné que $\int W(r) d^2r = \gamma_2 \pi \omega_0^2$, la concentration est finalement donnée par l'équation suivante 5.5 :

$$C = \frac{1}{(G(0) - 1) \pi \omega_0^2} \quad (5.5)$$

5.1.3 Calcul du nombre de molécules présentes sur la surface d'un échantillon par analyse statistique des fluctuations de fluorescence.

Le nombre moyen de molécules $\langle N \rangle$, et par conséquent C , peuvent être calculés par l'analyse des fluctuations de fluorescence en utilisant les propriétés temporelles de ces fluctuations. Parmi les méthodes possibles, notons celle des cumulants [Müller, 2004]. $\langle N \rangle$ peut être obtenue grâce au calcul des deux premiers moments de la distribution statistique du nombre k de photons détectés pendant chaque intervalle de temps δt (typiquement, δt vaut 0.1 ms). A partir de la moyenne $\langle k \rangle$, de la variance $\langle \Delta k^2 \rangle$ estimées sur des intervalles de temps $\Delta t \gg \delta t$ (Δt vaut typiquement 500 ms) on peut déduire $\langle N \rangle$ avec la formule suivante [Chen et al., 1999] :

$$\langle N \rangle = \gamma_2 \frac{\langle k \rangle^2}{\langle \Delta k^2 \rangle - \langle k \rangle} \quad (5.6)$$

5.1.4 Dispositif expérimental et surfaces utilisées.

Le dispositif expérimental

Le dispositif développé par Antoine Delon et de Yoann Blancquaert présenté sur la fig. 5.2 a été modifié pour réaliser nos expériences.

Le diamètre d'un laser (LASOS) est agrandi et envoyé vers un miroir dichroïque. Ce miroir réfléchit la longueur d'onde d'excitation (488 nm) mais se comporte comme un filtre passe-haut pour la transmission (vers les 520 nm). La partie réfléchie est focalisée sur l'échantillon par un objectif x60 à eau de grande ouverture numérique : N.A = 1.2 (Olympus), possédant une bague de correction d'épaisseur. La fluorescence émise est collectée par le même

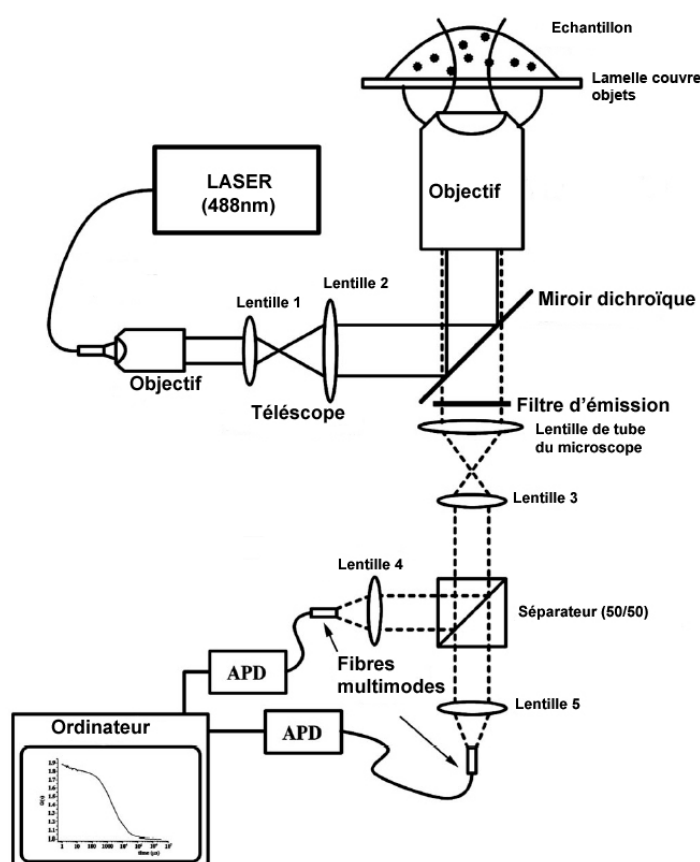


FIG. 5.2 – Principe du montage expérimental pour les expériences de FCS classiques (d'après [Blancquaert, 2006])

objectif, traverse le miroir dichroïque et est envoyée vers un détecteur.

Le dispositif de départ n'était pas adapté afin de réaliser la caractérisation de surfaces. Comme cela a été cité précédemment, la surface doit être déplacée à une vitesse V constante, pour pouvoir générer des fluctuations de fluorescence. Le déplacement de la surface est réalisé par l'adaptation des échantillons sur un porte-échantillon attaché sur un piézoélectrique. Les déplacements sont asservis par un programme écrit en LabVIEW. Un balayage typique est présenté sur la figure 5.3. Nous enregistrons le signal de fluorescence par l'intermédiaire d'un compteur de photons (figure 5.4).

Les expériences nous ont amené à résoudre des problèmes techniques et à optimiser plusieurs aspects du montage expérimental. Tout d'abord, il faut s'assurer que lors du balayage, le faisceau laser reste focalisé sur la lamelle. Ainsi, on règle le parallélisme du porte-échantillon attaché au piézoélectrique pour que la lamelle reste parallèle au plan de focalisation du laser au cours du balayage. Pour cela, on déplace le piézoélectrique à la main tout en regardant la tâche de fluorescence. Une diminution de la tâche de fluorescence indique une défocalisation. Par la suite, on s'est rendu compte qu'au cours du balayage de l'échan-

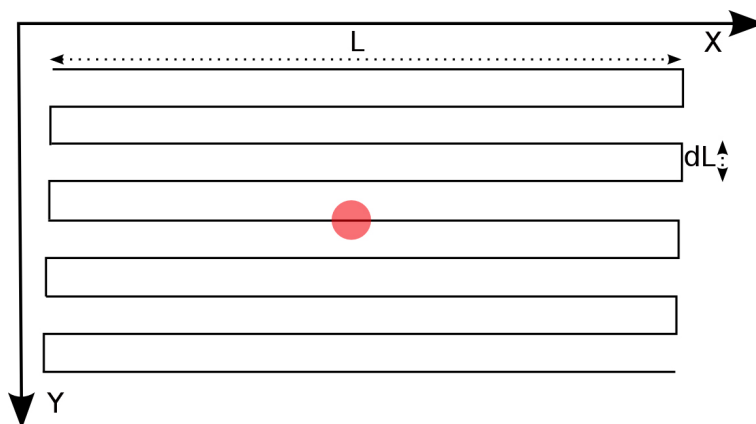


FIG. 5.3 – Schéma présentant les balayages réalisés sur nos surfaces. Typiquement, L vaut $100\ \mu\text{m}$ et dL vaut $1\ \mu\text{m}$. Le point rouge représente le laser focalisé sur la lamelle.

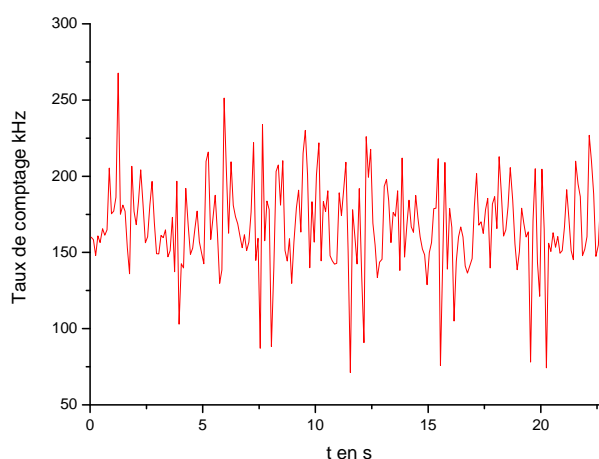


FIG. 5.4 – Nombre de photons comptés en kHz au cours d'un scan de 23 s.

tillon, la focalisation du faisceau laser changeait et ceci de façon monotone (toujours une défocalisation au cours du déplacement). On ne pouvait donc pas imputer cela à un mauvais positionnement de la lamelle par rapport au plan de balayage. Lors d'un balayage, l'objectif dérivait lentement d'une fraction de microns et cela perturbait les mesures. Pour remédier à cela, on a installé une surplatine (IX2-NPS) jouant le rôle de stabilisateur mécanique (cette surplatine est découplée de la platine habituelle du microscope et solidaire de l'objectif). Ensuite, on s'est rendu compte que les déplacements du piézoélectrique ne correspondaient pas aux déplacements demandés. Ainsi, en bout de ligne, des trous dans le taux de comptage apparaissaient comme si le faisceau laser restait immobile et photoblanchissait les molécules. Le programme a donc été modifié afin de s'assurer de la concordance entre le déplacement demandé au piézoélectrique et son déplacement réel.

Des balayages sont effectués sur différents endroits de la surface afin d'étudier l'homogénéité de greffage de notre lamelle. De plus, ces balayages vont pouvoir nous renseigner sur la valeur locale (typiquement un balayage correspond à une surface de $1200 \mu m^2$) du nombre de molécules greffées. Par exemple, nous serons capable d'observer un éventuel gradient de molécules : si nous avons un gradient de concentration de molécules suivant la direction X de balayage, on s'attend à ce que le nombre de photons comptés augmente ou diminue selon que le gradient soit positif ou négatif, se traduisant par des oscillations du signal dont la période ($2L$) correspond à une paire de lignes. En revanche, si nous avons un gradient selon la direction Y de balayage, la courbe n'aura pas une valeur moyenne constante mais une ligne de base montante ou descendante comme illustré sur la figure 5.5, du fait de la petitesse de l'interligne dL (figure 5.3).

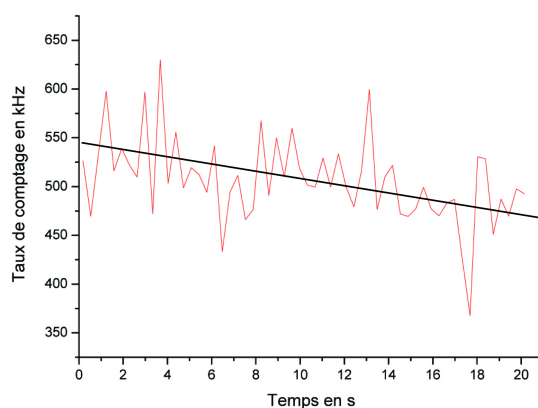


FIG. 5.5 – Taux de comptage du nombre de photons au cours d'un balayage de plusieurs lignes présentant une ligne de base décroissante, caractéristique de la présence d'un gradient de molécules fluorescentes selon la direction Y.

Les surfaces utilisées.

Les surfaces ont été préparées à l'aide du protocole présenté au chap 4. Elles ont été greffées avec le peptide AV20KH et avec de l'histidine GFP. L'histidine GFP étant purifiée suivant le protocole A. Les lamelles recouvertes du peptide AV20KH conservées dans une solution d'azide et de PBS sont rincées à l'eau ultrapure. Le PQS est un fluorophore permettant de reconnaître spécifiquement des groupements histidine via une chélation entre des groupements Ni-NTA présents sur le PQS et des histidines. Ses spectres d'absorption et d'émission sont présentés sur la figure 5.6. Afin de rendre fluorescentes les histidines greffées sur la surface, nous déposons sur les lamelles une solution de ProQSapphire 488 (PQS) pur (sa concentration a été estimée à $36 \mu mol/L$ par des mesures de FCS en solution grâce à des dilutions successives) dans laquelle furent dilués des cristaux de nickel dans des proportions équimolaires, pendant une heure. Ensuite, les lamelles sont rincées doucement et hydratées avec une solution d'HEPES (10 mM) à un pH de 7.5.

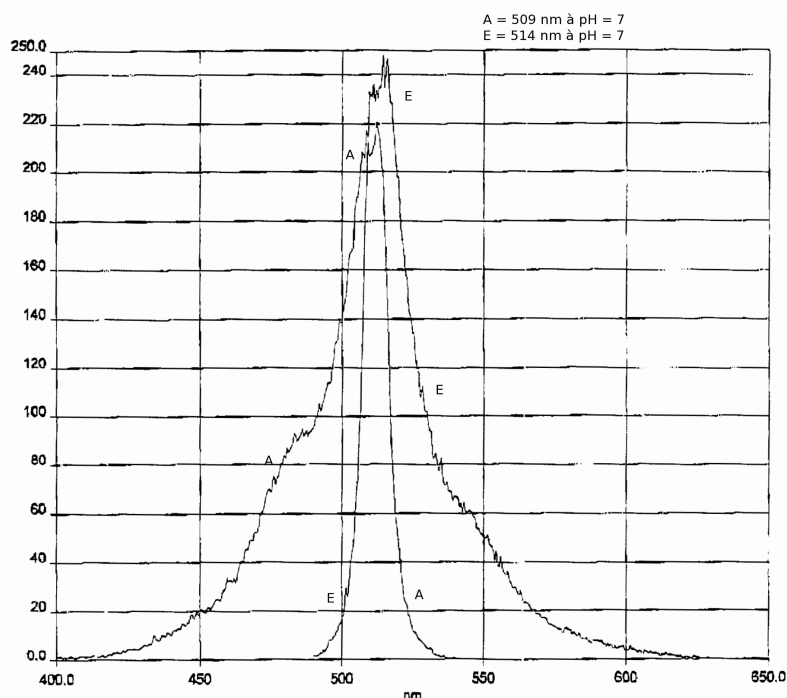


FIG. 5.6 – Spectre d’absorption et d’émission du ProQSapphire 488 : à un pH de 7, le pic d’absorption se situe à 509 nm et le pic d’émission se situe à 514 nm.

Les lamelles recouvertes d’histidine GFP sont simplement hydratées au cours des expériences avec une solution d’HEPES (10 mM) à un pH de 7.5.

Nos expériences ont été menées de la façon suivante : on place le faisceau laser à un endroit de la lamelle et la position en z de l’objectif est optimisé afin d’avoir un maximum de fluorescence. Ce maximum de fluorescence correspond à un positionnement optimal du volume confocal sur la lamelle. Ensuite, on réalise des acquisitions du signal de fluorescence à différents endroits de la lamelle. Typiquement, on utilise une puissance du laser de $20 \mu\text{W}$ pour les lamelles recouvertes d’histidine GFP et une puissance de $100 \mu\text{W}$ pour les lamelles fonctionnalisées avec le peptide AV20KH. Les vitesses de balayage sont comprises entre 20 et $60 \mu\text{m/s}$ et correspondent à un $\tau_c = \omega_0/V$ de 11 et 4 ms .

5.1.5 Résultats

On s’est intéressé à caractériser une lamelle traitée avec le peptide AV20KH et deux lamelles recouvertes d’histidine GFP, fonctionalisée à l’aide du protocole 2. On a effectué des balayages de la surface à plusieurs endroits. On a pu ensuite comparer le nombre de molécules obtenu par la valeur en 0 de la fonction d’autocorrélation (équation 5.4), N_{AC} , avec le nombre de molécules calculé par la méthode des fluctuations (équation 5.6), N_{FLU} , pour deux δt différents (δt doit être plus petit que τ_c le temps de décorrélation dont la valeur est de plusieurs millisecondes). Les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

5.1

De façon générale, nous retrouvons sur nos différents enregistrements la même caractéristique : le nombre de molécules varie plus (en relatif par rapport à 0) au cours d'un enregistrement que le niveau du taux de comptage des photons et ceci pour deux raisons :

- s'il y a une particule brillante sur la surface (une petite poussière, un petit cristal de sel ou encore un agrégat de molécules), cela va créer une importante fluctuation locale (un "burst" de fluorescence) et par conséquent un nombre apparent et local de molécules très faible comme nous pouvons le voir sur la figure 5.7
- inversement, s'il y a un trou de fluorescence (créé par exemple volontairement en photoblanchissant localement l'échantillon), seuls restent les photons parasites qui, même s'ils sont très peu nombreux, ont un bruit de grenaille qui correspond à un nombre local apparent de molécules très élevé.

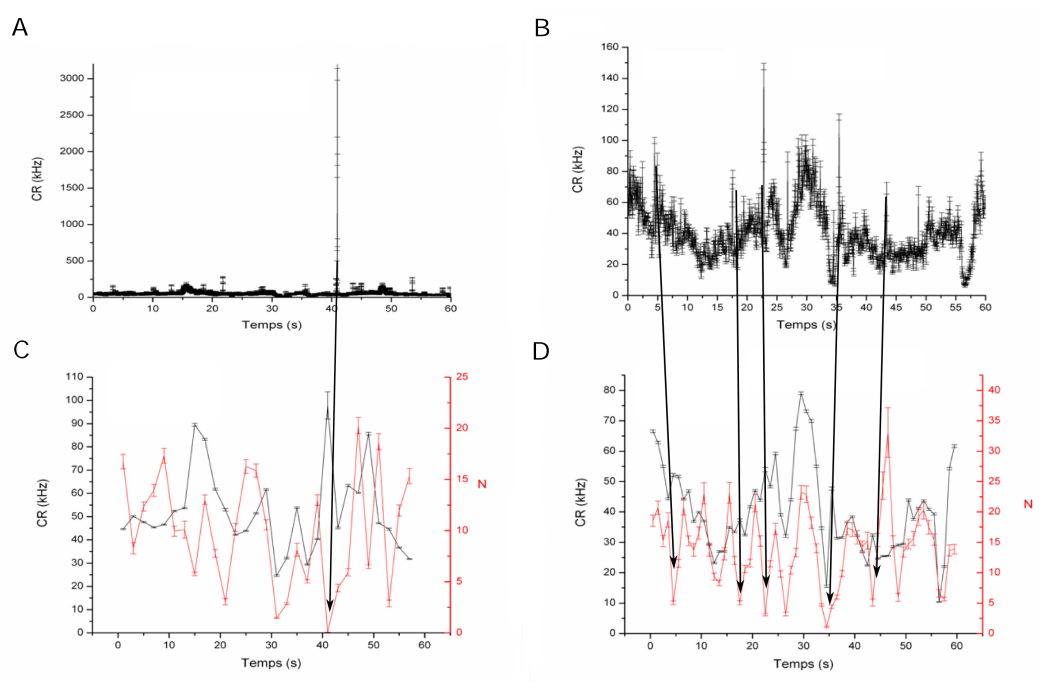


FIG. 5.7 – Correspondance entre la présence de "burst" dans le taux de comptage (CR) et un nombre de molécules proche de 0. A : taux de comptage présentant un "burst" à 41 s ce qui se traduit en C par un nombre de molécules (courbe rouge) localement très faible (proche de 0). En B, nous avons l'enregistrement d'un taux de comptage présentant plusieurs "burst", qui se traduisent directement par des nombres locaux de molécules très faibles sur la courbe D

Généralement, lors d'un balayage, si nous ne rencontrons pas de "burst" ou de trou de fluorescence, le taux de comptage et le nombre de molécules calculés par la méthode des cumulants sont corrélés : figure 5.8 Nous constatons sur le tableau 5.1 que le nombre de molécules calculé par la méthode des cumulants est en très bon accord avec le nombre de molécules calculé avec l'amplitude de la fonction d'autocorrélation. Par contre, de temps en

Peptide	N_{AC}	δt (μs)	N_{FLU}
1	58	100 1000	60 61
2	33	100 1000	36 34
3	40	100 1000	39 40
4	33	100 1000	33 33
5	16	100 1000	16 17
6	5	100 1000	5 6
7	14	100 1000	14 14
8	3	100 1000	3 3
9	20	100 1000	20 20
10	29	100 1000	29 29
11	10	100 1000	9 9
12	20	100 1000	19 20
13	5	100 1000	5 6
14	37	100 1000	35 36
15	30	100 1000	29 30
16	41	100 1000	41 41

Histi GFP1	N_{AC}	δt (μs)	N_{FLU}
1	25	100 1000	15 21
2	25	100 1000	18 23
3	27	100 1000	20 26
4	52	100 1000	29 51
5	8.33	100 1000	8 8
6	4	100 1000	4 4
7	50	100 1000	28 48

Histi GFP2	N_{AC}	δt (μs)	N_{FLU}
1	20	100 1000	19 20
2	76	100 1000	62 72
3	14	100 1000	12 13
4	71	100 1000	57 66
5	17	100 1000	17 17
6	18	100 1000	18 18
7	37	100 1000	36 36
8	31	100 1000	31 30
9	12	100 1000	12 12
10	21	100 1000	20 20
11	15	100 1000	15 15
12	12	100 1000	12 12
13	5	100 1000	5 5
14	5	100 1000	4 4
15	19	100 1000	19 19
16	5	100 1000	5 5
17	24	100 1000	24 24
18	28	100 1000	26 27

TAB. 5.1 – Tableau présentant le nombre de molécules calculé à l'aide de la fonction d'auto-corrélation (N_{AC}) et le nombre de molécules calculé par la méthode des fluctuations N_{FLU} , pour deux échantillonnages sur une lamelle recouverte du peptide AV20KH et sur deux lamelles recouvertes d'histidine-GFP.

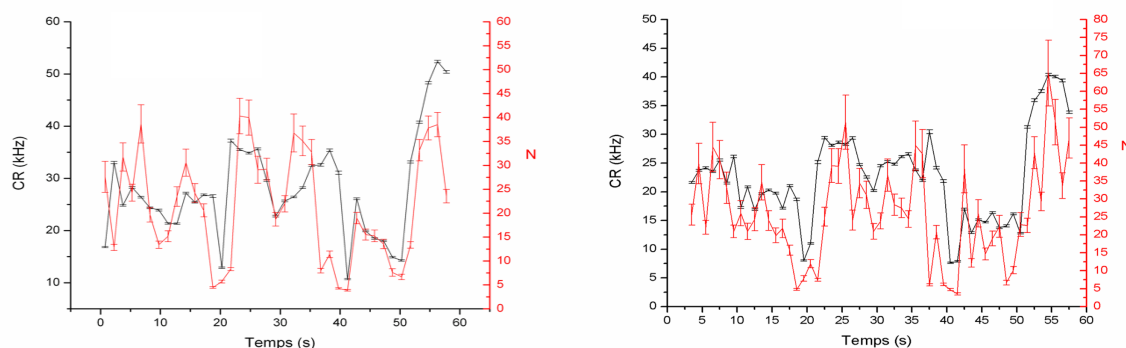


FIG. 5.8 – Ces deux courbes représentent le taux de comptage enregistré sur deux endroits différents d’une même lamelle recouverte d’histidine GFP et le nombre de molécules présentes localement. Le nombre de molécules est calculé par la méthode des cumulants. Sur ces deux enregistrements, nous observons une très bonne corrélation entre le signal de fluorescence (le taux de comptage) et le nombre de molécules calculé.

Nom	C_{max} (molécules/ μm^2)	C_{min} (molécules/ μm^2)
AV20KH	391	38
Histidine GFP1	474	34
Histidine GFP2	338	31

TAB. 5.2 – Tableau présentant les concentrations maximales et minimales du nombre de molécules se trouvant sur une lamelle traitée avec le AV20KH et sur deux lamelles traitées avec de l’histidine GFP.

temps, nous observons une légère différence dans le calcul du nombre moyen de molécules suivant le pas d’échantillonnage utilisé : 100 ou 1000 μs . Au sein d’un même échantillon nous observons de fortes variations du nombre moyen de molécules, qui semblent caractériser d’un substrat peu homogène.

A partir de ces nombres de molécules, nous avons tenté de calculer une concentration locale grâce à 5.5 en prenant pour la taille du waist $\omega_0 = 0.22 \mu\text{m}$. Ce résultat est présenté sur le tableau 5.2

A partir de considérations mathématiques utilisées en physique on a essayé de caractériser des surfaces biologiques. Nous constatons pour ces 3 lamelles une dispersion dans la concentration locale de molécules, avec des concentrations locales qui restent globalement identiques d’une lamelle à l’autre.

La FCS nous a permis de voir que nos surfaces sont peu homogènes avec des concentrations locales de molécules variant d’un facteur 10. Compte tenu du dispositif initial et des problèmes rencontrés, le résultat majeur est méthodologique. Il devient possible à l’avenir d’utiliser la FCS comme outil de caractérisation de surface. Ces expériences donnent des résultats qualitatifs avec des ordres de grandeurs du taux de greffage. Ces ordres de grandeurs

semblent indiquer que les substrats ne sont pas parfaitement homogène mais on verra dans les résultats que les expériences en écoulement sont fiables.

5.2 Caractérisation des surfaces par microscopie confocale

Nous avons tenté de caractériser nos surfaces à l'aide d'un microscope confocal. Le principe reste pratiquement le même que pour le principe de la FCS. Nous excitons des molécules fluorescentes dans le volume confocal d'un faisceau laser (la longueur d'onde du faisceau laser est de 488 nm). A partir de la fluorescence mesurée et récupérée pour des longueurs d'ondes supérieures à 514 nm, on veut obtenir une bonne estimation du nombre de molécules présentes sur la surface.

Pour cela, nous mesurons la fluorescence dans un volume d'excitation d'une épaisseur de 0.1 μm . Afin de relier une fluorescence mesurée à une concentration donnée de molécules, nous devons faire une courbe d'étalonnage de la fluorescence du fluorophore. Ainsi, nous allons mesurer la fluorescence émise par une solution de fluorophore à une concentration C connue. Ensuite, nous diluons cette solution et pour chaque dilution, nous mesurons la fluorescence et ceci afin de tracer une courbe représentant la concentration en fonction de la fluorescence mesurée. Cette concentration peut ensuite être ramenée à un nombre de molécules.

En pratique, nous déposons sur une lamelle 6 μL d'une solution de fluorophore à une concentration C connue. Cette goutte est ensuite recouverte par une lamelle, en faisant attention à ne pas créer de bulles. Le tout est ensuite fermée hermétiquement (on scelle les bords avec du vernis) afin de prévenir tout risque d'évaporation. Ces opérations sont ensuite répétées avec des concentrations décroissantes : $C/2$, $C/4$, $C/8$, $C/10$, $C/12$, $C/16$. Pour chacun de ces échantillons, nous mesurons la fluorescence correspondante en plusieurs endroits. Nous pouvons alors tracer la courbe d'étalonnage donnant le nombre de molécules fluorescentes en fonction de l'intensité de fluorescence. Ensuite, il suffit de prendre la surface que l'on souhaite caractériser, de mesurer sa fluorescence et grâce à la courbe d'étalonnage précédemment construite, d'obtenir le nombre de molécules greffées.

Par cette méthode, nous avons voulu caractériser nos lamelles recouvertes du peptide AV20KH afin d'obtenir une idée du taux de greffage. Nous avons tracé la courbe d'étalonnage du ProQSaphire. Malheureusement, le PQS est très mal excité pour une longueur d'onde de 488 nm (figure 5.6). Le signal de fluorescence est alors diminué. La figure 5.2 présente deux courbes d'étalonnage du ProQSaphire.

Ces courbes d'étalonnage nous montrent clairement que le PQS est un très mauvais fluorophore : afin d'obtenir une faible fluorescence, nous devons exciter 10000 molécules/ μm^2 . Or la FCS nous a montré qu'au maximum, nous n'avons que 400 molécules/ μm^2 . Il nous est donc impossible de déterminer une densité de greffage pour les lamelles recouvertes du peptide AV20KH avec ce fluorophore par une technique de microscopie confocale quantitative. De plus, ce fluorophore a été choisi car il était le seul à pouvoir se fixer spécifiquement sur des groupements histidine.

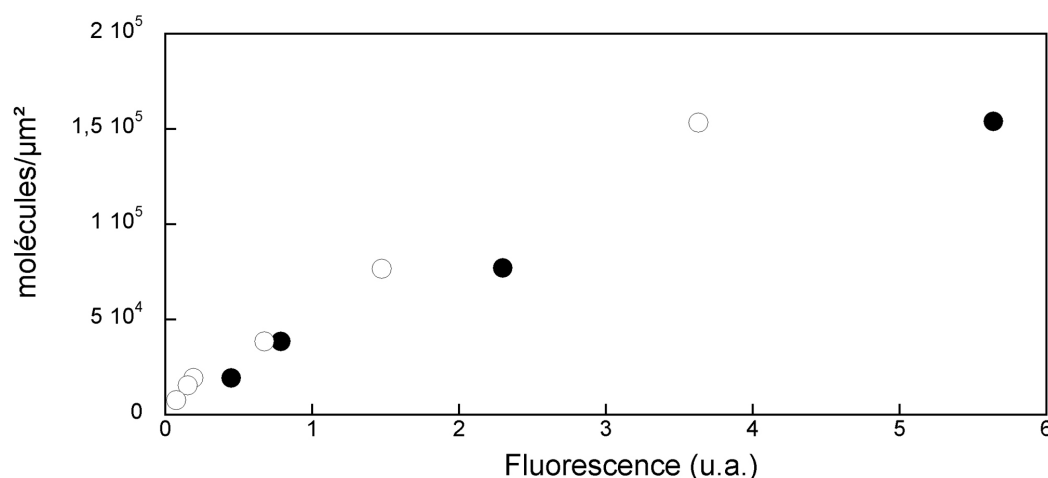


FIG. 5.9 – Courbes présentant le nombre de molécules/ μm^2 en fonction de la fluorescence mesurée en unité arbitraire. Nous avons procédé à deux étalonnages du PQS. On observe que nous devons au moins avoir 10000 molécules / μm^2 pour observer un signal de fluorescence.

5.3 Caractérisation par fluorescence des vésicules et les billes d'agarose

On s'est assuré de la présence de nickel sur nos objets chélatants que sont des vésicules électroformées avec du nickel à 20 % et des billes d'agarose. Pour cela, on a modifié notre peptide AV20KH en lui greffant du FITC (Fluorescein Iso ThioCyanate) un fluorophore. Le protocole est disponible en annexe B. Le peptide ainsi modifié va s'accrocher de façon spécifique aux têtes nickel se trouvant sur les vésicules et les billes. Nous avons ainsi préparé des vésicules électroformées à partir d'un mélange de DOPC/DOGS-NTA-Ni (80/20) et à partir de DOPC. Les vésicules électroformées avec le lipide DOGS-NTA-Ni sont fluorescentes quand elles sont incubées avec le AV20KH-FITC (figure 5.10) alors que les vésicules DOPC ne le sont pas. De même nos billes chélatantes sont visibles en fluorescence quand elles sont incubées avec le peptide modifié.

Nous avons observé que lors d'une électroformation, les vésicules n'avaient pas le même taux de couverture de lipides à têtes nickel. La figure 5.11 montre l'intensité de fluorescence de vésicules issues d'une même électroformation et incubées dans le peptide fluorescent.

Nous observons une distribution d'intensité de fluorescence indiquant que les vésicules ne sont pas toutes recouvertes de la même quantité de nickel.

5.4 Conclusion

Nos diverses expériences montrent que nous arrivons à greffer des histidines sur une surface. En effet, l'incubation de nickel fluorescent sur une surface recouverte d'histidine rend la surface fluorescente. On a proposé une nouvelle approche de caractérisation de surface

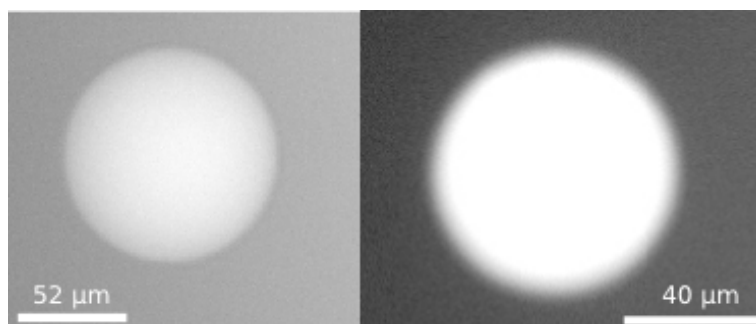


FIG. 5.10 – Vésicules électroformées avec 20 % de lipide NTA-Ni et billes d'agarose chélatantes rendues fluorescentes par reconnaissance spécifique entre le nickel et les histidines du peptide modifié.

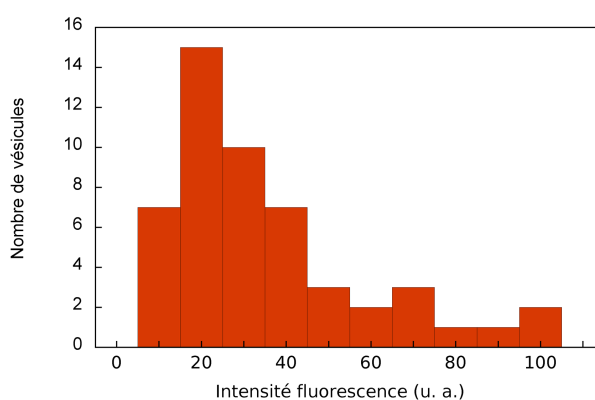


FIG. 5.11 – Intensité de fluorescence de vésicules recouvertes de nickel et incubées dans une solution de AV20KH-FITC. La fluorescence représentée est la différence entre la fluorescence mesurée au centre de la vésicule et la fluorescence mesurée en dehors de la vésicule.

qui utilise la FCS, qu'on n'a pas eu le temps de développer pour avoir des résultats quantitatifs. Enfin, les vésicules et les billes sont rendues fluorescentes par une chélation (et donc une reconnaissance spécifique) entre le nickel des billes se trouvant sur une surface et des histidines se trouvant, elles, en solution.

Chapitre 6

Méthodes d'observation et mise en place de l'écoulement de cisaillement.

Ce chapitre est consacré aux techniques générales utilisées au cours de l'étude de nos objets. Nous expliciterons dans un premier temps les deux principales techniques de microscopie utilisées (la microscopie à contraste de phase et à contraste interférentiel), puis nous passerons en revue les différentes chambres d'écoulement utilisées avant d'exposer les aspects de vidéo microscopie, de traitements d'image.

6.1 Les différentes techniques de microscopie utilisées

Un microscope à fond clair permet d'observer les objets qui constituent l'échantillon car ces derniers modifient l'intensité, par exemple par absorption. Il est alors aisé d'imager en fond clair des particules absorbant fortement la lumière lorsqu'elles sont plongées dans un solvant (l'eau) qui absorbe peu. Le profil des particules se détache dans ce cas sur l'image formée par le microscope. On parle d'objets d'amplitude car ces objets modifient nettement l'amplitude de l'onde électromagnétique (photons) qui les traverse. Certains objets modifient peu l'amplitude de l'onde, i.e. la transmission de l'échantillon est la même en tout point et l'indice optique varie peu. Cependant, si l'amplitude de l'onde est peu altérée par les objets de l'échantillon, la phase de l'onde est beaucoup plus sensible aux variations d'indice. C'est cette propriété qui est utilisée dans la microscopie à contraste de phase.

6.1.1 Le microscope à contraste de phase

Le principe d'un microscope à contraste de phase est présenté sur la figure 6.1 et il consiste à introduire un déphasage de $\pi/2$ sur l'onde directe afin que l'intensité dépende directement de la phase et donc de l'indice optique du milieu traversé.

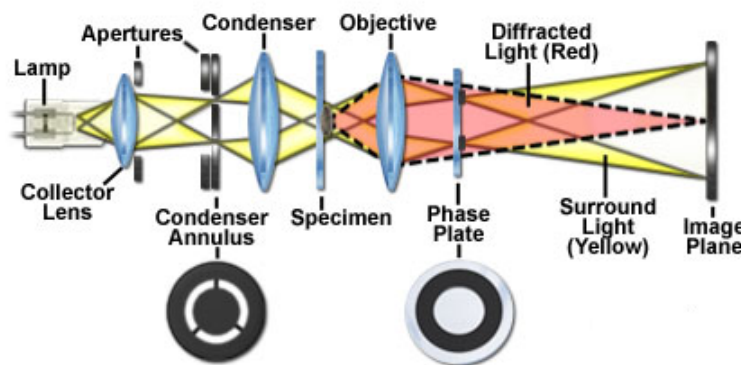


FIG. 6.1 – Principe de la microscopie à contraste de phase.

Pour cela, on place une lame quart d'onde que l'on appelle anneau de phase dans le plan conjugué du diaphragme annulaire. Cette lame quart d'onde est montée à l'intérieur de l'objectif. Ainsi on ne déphase que la lumière incidente et pas la lumière diffusée par l'échantillon. En faisant varier la phase de l'onde, on fait alors varier son amplitude et donc

l'intensité. Le principal avantage de la microscopie à contraste de phase est de permettre la visualisation rapide et précise des vésicules : elles apparaissent en noir sur un fond plus clair (6.2) et entourées d'un halo lumineux blanc. Le sucrose interne et le glucose externe n'ayant pas le même indice optique, leurs phases sont différentes. De plus, la microscopie à contraste de phase permet de vérifier que la vésicule renferme toujours sa solution interne.

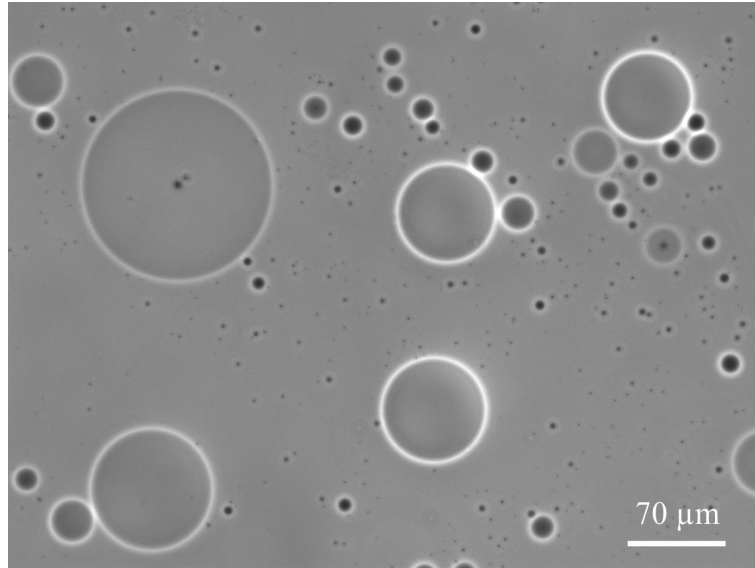


FIG. 6.2 – Vésicules renfermant une solution de sucrose, suspendues dans une solution de glucose de même osmolarité observées par microscopie à contraste de phase

6.1.2 La microscopie à contraste interférentiel en réflexion : RICM

La microscopie par contraste interférentiel en réflexion (RICM) permet d'observer et de caractériser des films minces. Soit une vésicule au voisinage d'une lame de verre éclairée par une source de lumière monochromatique de longueur d'onde $\lambda = 546$ nm. Si la distance vésicule/paroi est suffisamment faible, de l'ordre de grandeur de la longueur d'onde de la lumière, les réflexions successives sur la lame de verre I_1 et sur la vésicule I_2 vont conduire à des interférences (figure 6.3). La position et le contraste des interférences permettent de remonter à la distance séparant la vésicule de la lame de façon très précise, ainsi qu'au profil de la vésicule $h(x)$ [Rädler and Sackmann, 1993]. Ainsi, l'intensité obtenue dépend de $h(x)$ selon la relation suivante :

$$I(h(x)) = I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} \cos \left[\frac{2\pi h(x)}{i} \right] \quad (6.1)$$

avec $i = \lambda/2n_1$, l'interfrange, n_1 est l'indice de réfraction du milieu.

Pour des objets réfléchissant très peu la lumière, il est nécessaire de s'affranchir de toute réflexion parasite. Pour cela, on place un polariseur après la source lumineuse, et une lame quart d'onde ($\lambda/4$) à la sortie de l'objectif, de façon à ce qu'après avoir traversé l'objectif

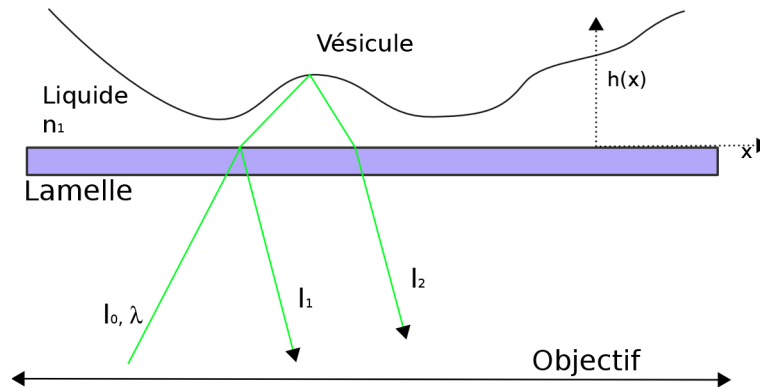


FIG. 6.3 – Principe du RICM : une lumière monochromatique d'intensité I_0 et de longueur d'onde λ est envoyée sur une vésicule au voisinage d'une surface. Il y a formation d'interférences entre les faisceaux réfléchis par la surface, d'intensité I_1 , et ceux réfléchis par la vésicule, d'intensité I_2 . n_1 est l'indice de réfraction du milieu. La mesure de l'interférogramme permet d'obtenir la distance $h(x)$ entre la vésicule et la lamelle.

et la lame $\lambda/4$, le faisceau soit polarisé circulairement. Les rayons réfléchis par l'interface traversent une deuxième fois la lame $\lambda/4$, et sont donc à nouveau polarisés linéairement, avec un déphasage de $\pi/2$ par rapport au rayon incident, dû à la réflexion. Ainsi l'analyseur placé avant l'oculaire, laissera passer les rayons ayant été réfléchis par l'échantillon et la lame de verre mais arrêtera les réflexions parasites [Rädler and Sackmann, 1993].

La figure 6.4 présente les franges d'interférences d'une vésicule recouverte de lipides nickel, fortement adhérente sur une surface recouverte d'histidine ainsi que le profil d'intensité selon la ligne noire. En utilisant l'équation 6.1 et en mesurant, sur le profil d'intensité, l'intensité maximale, I_{\max} de la première frange blanche et l'intensité minimale, I_{\min} , de la première frange noire, il est possible de calculer $h(x)$, la hauteur séparant la vésicule de la lamelle à partir de la relation suivante [Rädler and Sackmann, 1993] :

$$h(x) = \frac{\lambda}{4\pi n_1} \left[\arccos \left[\frac{2I(x) - (I_{\max} + I_{\min})}{I_{\max} - I_{\min}} \right] \right] \quad (6.2)$$

6.2 Les chambres d'écoulement

Afin d'étudier l'adhésion des billes et des cellules soumises à un écoulement de cisaillement, nous avons utilisé deux chambres d'écoulement différentes : une chambre classique permettant une vue de dessus et une chambre de flux nous autorisant une vue de côté des objets.

6.2.1 Chambre de flux classique

La chambre de flux utilisée pour toutes les expériences utilisant un microscope optique inversé est constituée d'un bloc de plexiglass comportant une cavité de 15.9 mm de longueur,

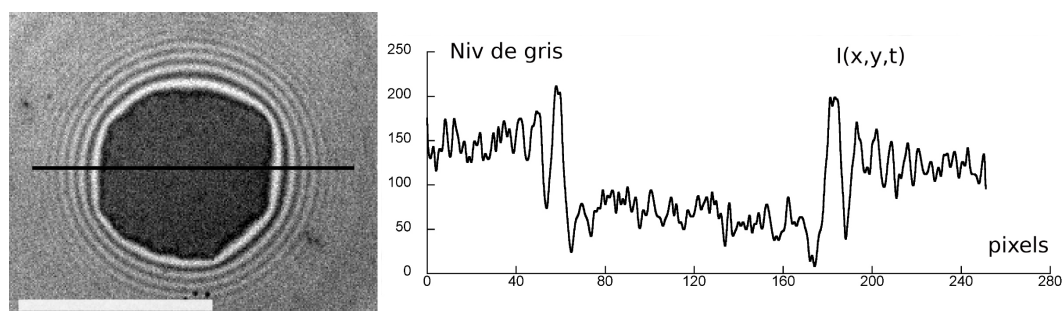


FIG. 6.4 – Observation d’une vésicule adhérente en RICM et son profil d’intensité en niveau de gris selon la ligne noire. La barre blanche représente 13 μm .

9.9 mm de largeur et 0.9 mm d’épaisseur entourée d’un joint torique. La lamelle est alors maintenue sur le joint par un bâti en cuivre fixé par quatre vis. Deux ouvertures faites dans le plexiglass permettent de faire circuler un fluide dans la cavité.

Les expériences utilisant cette chambre de flux furent menées soit sur un microscope inversé Zeiss Axiovert 200M soit sur un microscope inversé Olympus IX71. Ces deux microscopes sont équipés pour faire du RICM avec une lampe à fluorescence et des objectifs antiflex de grossissement x63.

6.2.2 Chambre de flux en vue de côté et le microscope couché

Chambre de flux en vue de côté

Les expériences en vue de côté nécessitent une chambre d’écoulement s’adaptant sur un microscope couché. Nous avons utilisé une cuve parallélépipédique en quartz à quatre faces optiques fabriquée par Hellma (Müllheim, Allemagne) d’une hauteur de 1 mm, d’une largeur de 11.5 mm et d’une longueur de 65 mm. Toutes les observations sont faites selon la plus petite dimension de la chambre d’écoulement. La chambre est ouverte de chaque côté afin de pouvoir faire circuler du fluide à l’intérieur. D’un côté, l’ouverture de la chambre correspond à une cheminée de diamètre 4 mm et de longueur 9 mm permettant l’injection du liquide et des objets. De l’autre côté, l’ouverture est parallélépipédique afin de pouvoir placer une lamelle à l’intérieur de la chambre. Il est à noter que lors des expériences en vue de côté, le bord de la lamelle n’étant pas poli, de multiples réflexions parasites empêchent l’obtention d’une image avec un bon contraste. Pour remédier à ce problème, les bords des lamelles sont noircis avec un feutre avant de les placer dans la chambre d’écoulement. La figure 6.5 présente les dimensions de la chambre d’écoulement.

Le microscope couché

La vue de côté est en fait une observation des objets dans un plan vertical parallèle à la gravité et au plan de cisaillement. Pour cela, nous avons couché un microscope à contraste de phase sur son flanc (Leica DM IRB, Wetzlar, Germany) afin de travailler en incidence rasante. Une image du microscope couché et un zoom sur la chambre d’écoulement montée

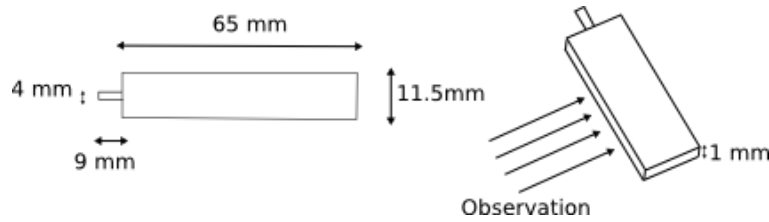


FIG. 6.5 – Dimension de la chambre de flux pour la vue de côté.

sur une platine est présentée sur la figure 6.6.



FIG. 6.6 – Le microscope couché permet une visualisation dans un plan parallèle à la gravité et au plan de cisaillement. 1 : Pousse-seringue, 2 : Microscope couché, 3 : caméra, 4 : téléviseur, 5 : Zoom sur la chambre d'écoulement.

6.3 Application d'un flux.

Le flux est appliqué en utilisant un pousse-seringue tel que présenté à la figure 6.6. Le pousse-seringue applique un flux suivant un débit arbitraire. Afin de connaître le taux de cisaillement à la paroi $\dot{\gamma}$ réellement appliqué nous devons procéder à une calibration de la chambre.

Pour des chambres d'écoulement où la largeur est plus grande que la hauteur, le champ de vitesse présente un profil parabolique du type Poiseuille tant que l'on est loin des parois. A l'échelle de nos objets, le profil du champ des vitesses est linéaire et le taux de cisaillement est directement proportionnel au débit du pousse-seringue.

Afin de calibrer le taux de cisaillement, nous avons mesuré la vitesse de déplacement de billes de polystyrène de $2 \mu\text{m}$ de diamètre en fonction de leur distance au substrat pour

différents débits du pousse-seringue. La vitesse des billes varie linéairement avec la hauteur, h , à laquelle elles se trouvent et la pente de cette droite $V = f(h)$ nous donne une mesure du taux de cisaillement. Ces mesures sont effectuées pour différents débits. En vue de côté, il nous est facile de mesurer la distance séparant les billes de la surface. En vue de dessus, nous avons calibré les graduations du vernier du microscope afin de savoir à quelle distance de la lamelle les billes sont observées. Des exemples de courbes de calibration expérimentales en vue de dessus sont présentées sur la figure 6.7.

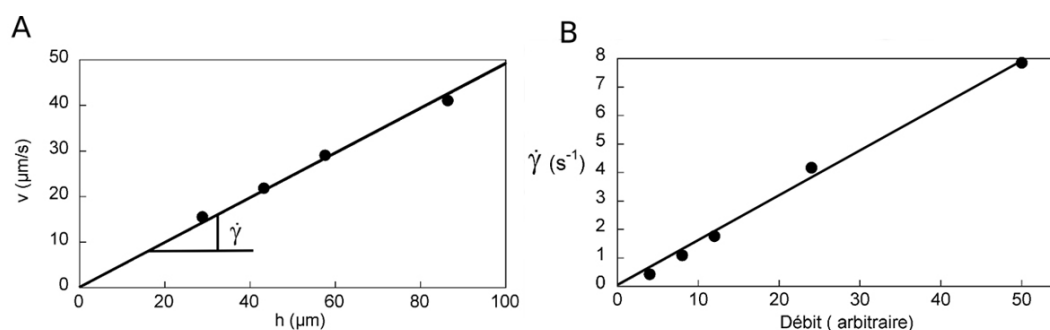


FIG. 6.7 – A : Représentation de l'évolution linéaire de la vitesse des billes en fonction de la distance à la surface (en vue de dessus). La pente donne la mesure du taux de cisaillement $\dot{\gamma}$. B : Calibration du taux de cisaillement $\dot{\gamma}$ en fonction d'un débit arbitrairement imposé.

6.4 Acquisition des images et numérisation

Nous avons utilisé deux types de caméras selon les microscopes utilisés. Toutes les expériences faites sur les microscopes Leica et Olympus (IX71) ont été visualisées avec une caméra CDD Cohu 4910 puis enregistrées grâce à un magnétoscope DV Cam Sony (DSR25) permettant un positionnement de la bande vidéo à l'image près. Les films sont ensuite numérisés par l'intermédiaire d'un Mac G5 grâce au logiciel Avid Free DV sous format quicktime (fichier portant une extension en .mov). Les expériences menées sur le microscope Zeiss (Axiovert 200 M) ont été enregistrées par une caméra digitale ORCA tri CCD C7780 21 (Hamamatsu). Les images sont acquises via un logiciel fourni par Hamamatsu (Wasabi). Nous obtenons alors des films contenant une séquence d'images sous format tiff à une résolution de 16 bits.

Les films quicktime peuvent être transformés en une suite d'images tiff par l'intermédiaire d'un logiciel gratuit (Bink and Smacker Rad Video Tools¹). Le logiciel XnView² permet ensuite d'appliquer des transformations identiques à plusieurs images. On peut ainsi transformer des images 16 bits en images 8 bits, les redimensionner, ou créer à partir de plusieurs images tiff un seul fichier multipages contenant toutes les images.

¹<http://www.radgametools.com/bnkdown.htm>

²<http://perso.orange.fr/pierre.g/xnview/frdownloadwin32.html>

Chapitre 7

Programmes de traitement d'images et de suivi automatique d'objets en déplacement.

Ce chapitre est consacré à l'élaboration des programmes permettant l'analyse et le suivi automatique d'objets soumis à un écoulement de cisaillement.

7.1 Détermination du contour d'un objet

Afin de déterminer le contour d'un objet, il est tout d'abord nécessaire de filtrer l'image afin de faire ressortir le contour. Pour cela nous utilisons le logiciel IDL et une routine écrite par John Crocker [Crocker and Grier, 1996] et disponible sur son site internet : le filtre *bpass*¹.

7.1.1 Le filtre *bpass*

Le filtre *bpass* est un filtre passe-bande spatiale qui supprime le bruit et lisse l'image tout en gardant les informations de l'image sur une taille caractéristique. Ce que l'on souhaite faire ressortir doit apparaître en blanc sur l'image d'origine. La figure 7.1 illustre le fonctionnement du filtre. Nous avons appliqué le filtre sur une image présentant des vésicules observées en contraste de phase. Le filtre *bpass* permet de faire ressortir le contour des vésicules de manière non ambiguë par l'intermédiaire du halo blanc.

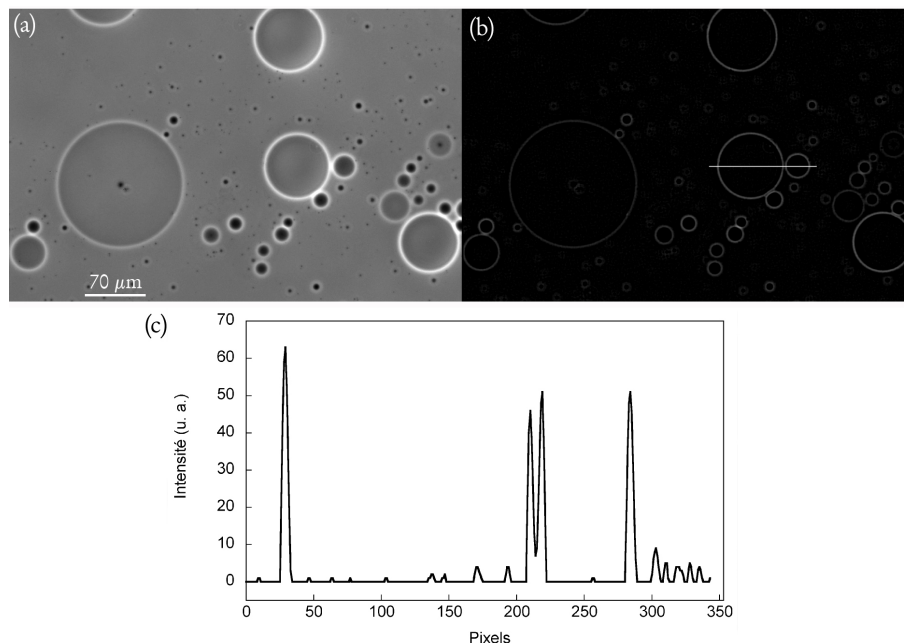


FIG. 7.1 – (a) : Images de vésicules vues en contraste de phase. (b) : Application du filtre *bpass*. sur l'image (a). (c) profil d'intensité pris sur la ligne blanche en (b). Le filtre permet de faire ressortir le contour des vésicules.

¹<http://www.physics.emory.edu/weeks/idl/>

7.1.2 Programme pour déterminer le contour d'un objet

Après application du filtre *bpass*, nous pouvons déterminer le contour d'un objet de forme quelconque à l'aide d'un programme développé par Pierre Bongrand (Laboratoire Adhésion cellulaire et Inflammation, INSERM U600, CNRS UMR6212, Marseille) que nous avons adapté à nos besoins.

Son principe est simple. En considérant que tous les pixels ayant une intensité supérieure à un seuil de départ fixé sont des murs infranchissables et à partir d'un pixel de départ auquel nous lui assignons une certaine orientation, nous allons trouver le pixel voisin satisfaisant la condition de seuil, puis à partir de ce pixel, trouver le pixel suivant jusqu'à ce qu'on revienne au pixel initial et avec la même orientation. Pour ce faire, nous définissons une table d'orientation présentée sur la figure 7.2. Ensuite, pour chaque orientation, nous définissons les matrices d'orientation selon x et y pour les pixels se trouvant devant (dev) le pixel et devant à droite (dev-drte) du pixel (figure 7.2) :

$$\text{dev-x} = [1, 0, -1, 0] \quad \text{dev-y} = [0, 1, 0, -1] \quad (7.1)$$

$$\text{dev-drte-x} = [1, 1, -1, -1] \quad \text{dev-drte-y} = [-1, 1, 1, -1] \quad (7.2)$$

Le premier chiffre de chaque matrice correspond à l'orientation 0, le deuxième à l'orientation 1, le troisième à l'orientation 2 et enfin, le quatrième à l'orientation 3.

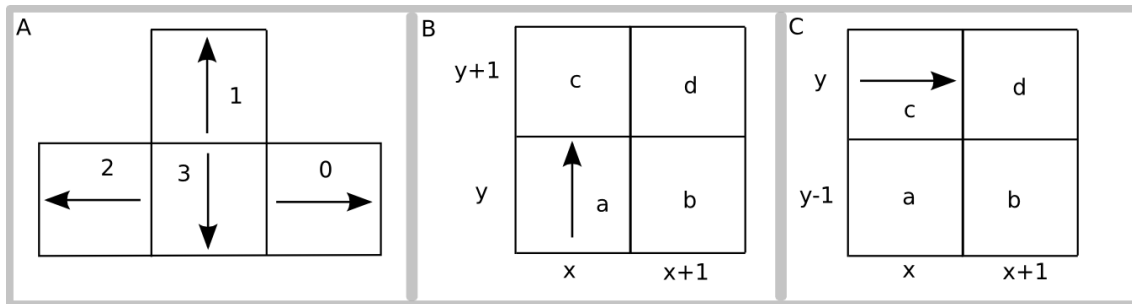


FIG. 7.2 – A : définition de la table d'orientation. B : exemple du calcul de la matrice d'orientation pour l'orientation 1. Si l'on se trouve au pixel *a* avec l'orientation 1, alors le pixel devant à la droite de *a* est le pixel *d*. Le pixel *d* se trouve en (x+1,y+1) par rapport au pixel *a*. Ainsi la matrice d'orientation dev-drte-x pour l'orientation 1 vaut 1 car on est en x+1 et celle de dev-drte-y vaut 1 car on est en y+1. De même, la matrice dev-x va valoir 0 car le pixel devant *a* qui est *c* est à même x mais la matrice dev-y va valoir 1 car *c* est en y+1. C : exemple du calcul de la matrice d'orientation pour l'orientation 0. Par un raisonnement identique, la matrice dev-drte-x vaudra 1 car le pixel devant à droite de *c* est *b* se trouvant en x+1 et la matrice dev-drte-y vaudra -1 car *b* est en y-1.

Il nous faut maintenant trouver le premier point du contour à partir duquel le programme cherchera le contour. Pour cela, nous donnons au programme la position d'un pixel se trouvant *dans* le contour puis nous cherchons le premier pixel se trouvant sur la même ligne (à y constant) satisfaisant les conditions suivantes :

- l'intensité du pixel *i* doit être plus grande que le seuil

- l'intensité du pixel voisin en $i+1$ est plus petite que le seuil

Le seuil est choisi de façon arbitraire par l'utilisateur sur l'image filtrée par le filtre *bpass* et il correspond à la plus petite des valeurs maximum observées sur les bords de l'objet. Le pixel i sera alors notre point de départ et nous lui affectons l'orientation 1. Ensuite, l'algorithme présenté sur la figure 7.3 est effectué.

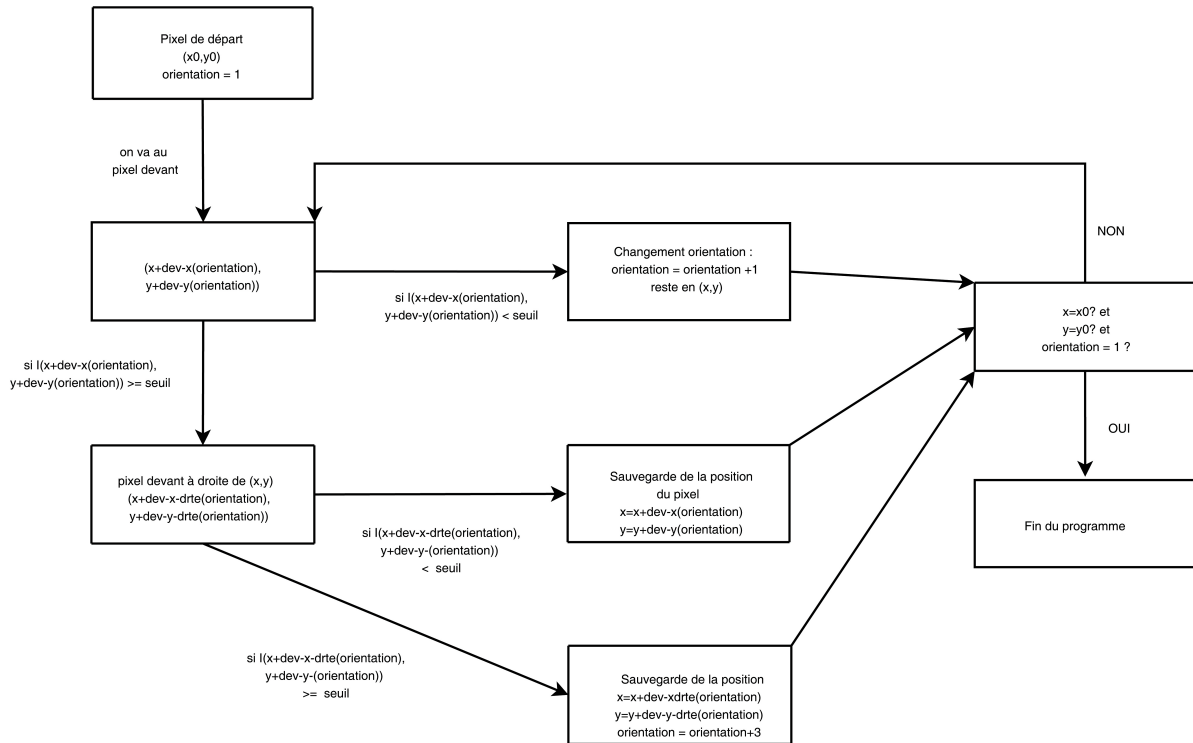


FIG. 7.3 – Algorithme du programme permettant la détection du contour d'un objet ayant une forme quelconque.

La figure 7.4 montre la détermination du contour d'une même vésicule présentant deux formes différentes : une forme allongée due à l'application d'un taux de cisaillement et une forme au repos. Il est ensuite assez facile d'insérer ce programme dans un autre programme permettant de déterminer le contour et le centre de masse de l'objet pour une suite d'images.

7.2 Suivi automatique de billes d'agarose observées en microscopie classique.

Ce suivi automatique a été effectué avec le logiciel IDL. Son principe est assez simple : on utilise la sphéricité des billes pour calculer la position de leurs centres de masse et du rayon sur plusieurs images successives à partir de trois points du contour. Ces trois points formant un triangle, il suffit de calculer le centre du cercle circonscrit au triangle pour trouver le centre et le rayon de la bille.

Le processus de suivi automatique est présenté de façon simplifiée sur la figure 7.5.

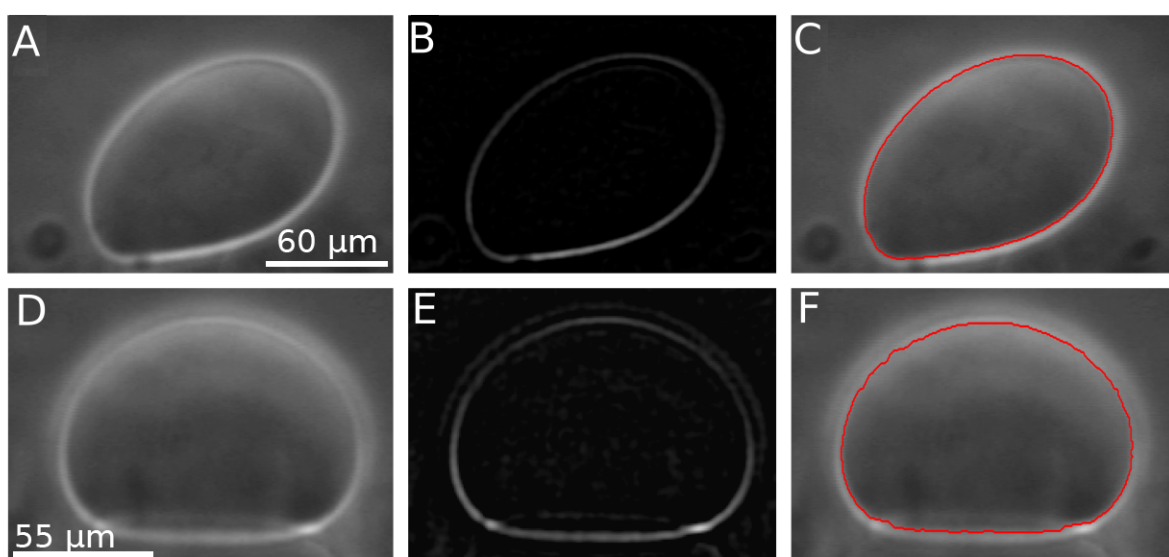


FIG. 7.4 – Exemples de détermination de contours. A : observation d'une vésicule en contraste de phase déformée par l'application d'un cisaillement hydrodynamique. B : application du filtre *bpass* sur l'image A afin de faire ressortir le contour de l'objet. C : détermination en rouge du contour de l'objet. D : observation de la même vésicule au repos (la seule force extérieure appliquée est la gravité). E : application du filtre *bpass* sur l'image D afin de faire ressortir le contour de l'objet. F : détermination du contour de la vésicule.

Le rayon de la bille ainsi que la position de son centre de gravité sont mesurés avec le logiciel Image J sur la première image. Ces valeurs sont rentrées dans le programme ainsi que les paramètres du filtre *bpass*. Après avoir inversé l'image en niveau de gris pour obtenir un contour clair et après application du filtre *bpass* sur la première image, le programme va chercher des points appartenant au contour de l'objet. Ces points sont recherchés à l'aide de la routine *feature* fournie par John Crocker [Crocker and Grier, 1996]. Elle permet de chercher des points ayant une certaine largeur. La largeur de points correspond à la largeur du contour de l'objet. Tous les points ayant une brillance inférieure à une brillance fixée sont supprimés. Ce seuil de brillance est déterminé de façon empirique, le programme permettant de tester tous les paramètres sur la première image et de les changer à volonté. Ensuite, il est nécessaire de s'assurer que les points restants appartiennent bien au contour. Pour cela, les points sont filtrés selon ces deux critères :

- tous les points dont les abscisses et les ordonnées se trouvent à une distance du centre de $\pm (R+15) \mu\text{m}$ sont conservés
- les points précédemment conservés doivent vérifier les équations suivantes dans le référentiel de la bille : $X^2 + Y^2 \geq (R-4)^2$ et $X^2 + Y^2 \leq (R+4)^2$

A cet instant, il ne reste que les points faisant partie du contour de la bille. Comme il ne suffit que de trois points pour déterminer le centre du cercle et son rayon, les points correspondant au sommet, au bas et à l'avant de la bille sont sélectionnés. Une dernière routine permet, connaissant trois points du contour, de déterminer le centre du cercle passant par ces trois

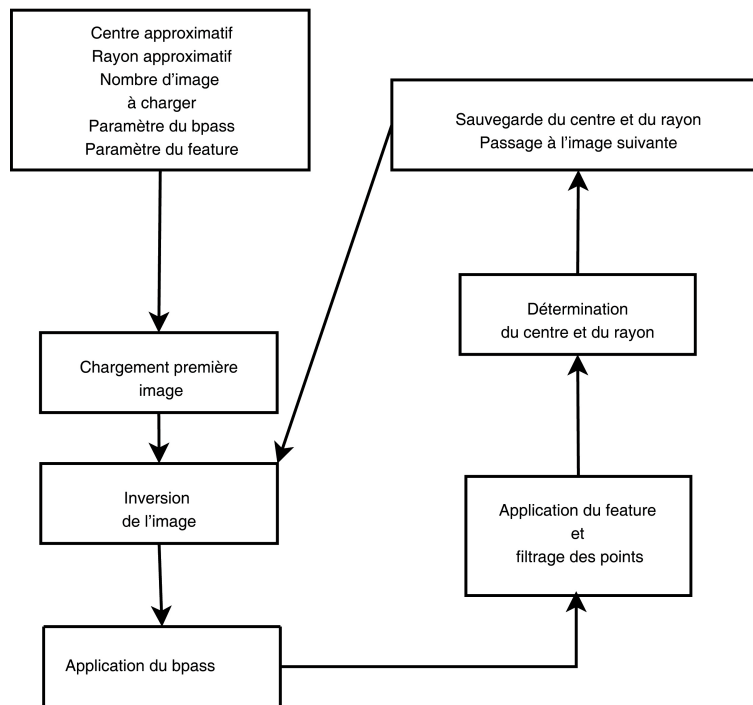


FIG. 7.5 – Diagramme représentant de façon simplifiée l'algorithme de suivi automatique des billes pour une séquence d'images.

points. La figure 7.6 montre une image d'une bille dont le contour n'est pas parfaitement focalisé. Malgré cela, nous déterminons de façon précise son centre et son rayon. La figure 7.7 nous montre l'image d'une bille bien focalisée avec un bord très net. A partir d'une telle image, il est facile de remonter à la détermination de son centre et de son rayon. Enfin, la figure 7.8 nous montre une image d'une bille se déplaçant sous l'effet d'un cisaillement hydrodynamique. La détermination du contour est rendue plus difficile mais malgré cela, nous arrivons à obtenir le centre de la bille et son rayon avec une bonne précision.

La principale cause d'incertitude dans ce programme de "tracking" est la détermination du contour avec une très bonne netteté. En effet, si le contour est un peu large, la détermination des points faisant partie du contour sera moins précise, ce qui entraînera une mauvaise précision dans la détermination du centre de l'objet.

7.3 Suivi automatique de billes d'agarose vues en RICM

7.3.1 Suivi de l'aire de la zone de contact

Afin de suivre automatiquement des billes d'agarose se déplaçant sous flux et observées en RICM, nous avons utilisé le logiciel IGOR et des routines développées par Laurent Limozin (Laboratoire Adhésion cellulaire et Inflammation, INSERM U600, CNRS UMR6212, Marseille). Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à déterminer l'aire de la zone d'adhésion et à la suivre au cours du temps. La figure 7.9 nous présente l'algorithme de



FIG. 7.6 – Traitement et calcul du centre de gravité d'une bille de $29\ \mu\text{m}$ de rayon se déplaçant lentement sous l'effet d'un cisaillement hydrodynamique avec une mauvaise focalisation sur son contour. A : image sans filtrage de la bille. B : inversion des niveaux de gris de l'image A. C : Application du filtre *bpass* sur l'image B. D : détermination de points faisant partie du contour. E : à partir de 3 points gardés de D, nous calculons la position du centre du cercle circonscrit au triangle défini par les 3 points, ainsi que son rayon R. Le point au centre représente le centre de ce cercle et le cercle en rouge est le cercle de rayon R et de centre le point rouge. Nous obtenons une très bonne détermination de la position du centre de gravité de la bille

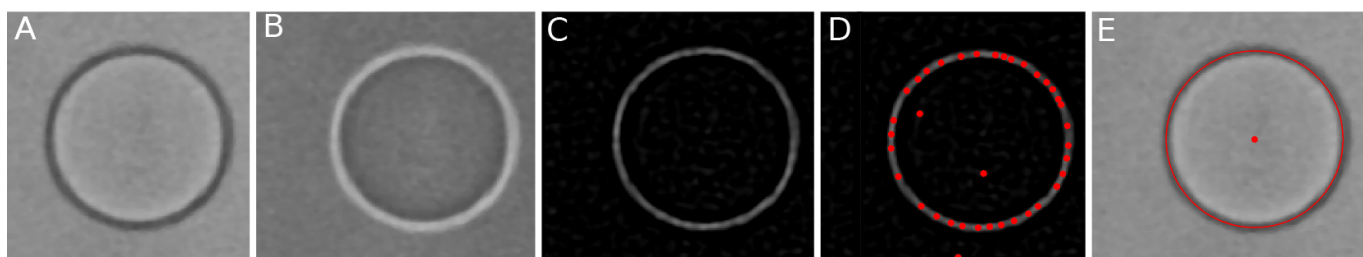


FIG. 7.7 – Traitement et calcul du centre de gravité d'une bille de $45.5\ \mu\text{m}$ de rayon se déplaçant lentement sous l'effet d'un cisaillement hydrodynamique avec une bonne focalisation sur son contour. A : image sans filtrage de la bille. B : inversion des niveaux de gris de l'image A. C : Application du filtre *bpass* sur l'image B. D : détermination de points faisant partie du contour. E : à partir de 3 points gardés de D, nous calculons la position du centre du cercle circonscrit au triangle défini par les 3 points, ainsi que son rayon R. Le point au centre représente le centre de ce cercle et le cercle en rouge est le cercle de rayon R et de centre le point rouge. Nous obtenons une très bonne détermination de la position du centre de gravité de la bille

suivi automatique de l'aire de contact.

On définit au départ un intervalle d'intensité (seuil d'intensité $\pm \Delta$ seuil) correspondant aux intensités des pixels de la zone de contact. Ensuite, nous choisissons un pixel se trouvant dans la zone de contact et dont l'intensité se trouve dans l'intervalle d'intensité précédemment choisi. Le programme va alors chercher tous les pixels voisins du pixel initial répondant au critère de seuil en intensité afin de créer une zone continue de pixels et ainsi de proche en proche, déterminer la zone d'adhésion comme nous le voyons sur la figure 7.10.

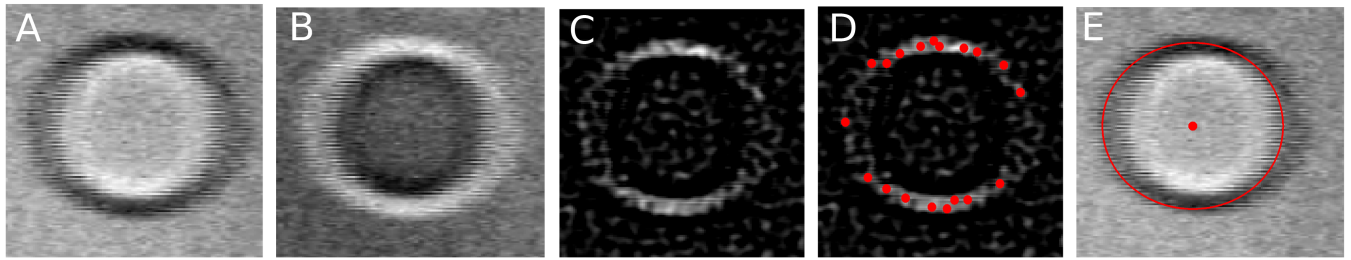


FIG. 7.8 – Traitement et calcul du centre de gravité d'une bille de $45.5 \mu\text{m}$ de rayon se déplaçant sous l'effet d'un cisaillement hydrodynamique. A : image sans filtrage de la bille. B : inversion des niveaux de gris de l'image A. C : Application du filtre *bpass* sur l'image B. D : détermination de points faisant partie du contour. E : à partir de 3 points gardés de D, nous calculons la position du centre du cercle circonscrit au triangle défini par les 3 points, ainsi que son rayon R. Le point au centre représente le centre de ce cercle et le cercle en rouge est le cercle de rayon R et de centre le point rouge. Nous voyons que malgré la faible qualité de l'image due au déplacement de l'objet, nous arrivons à calculer la position du centre de la bille.

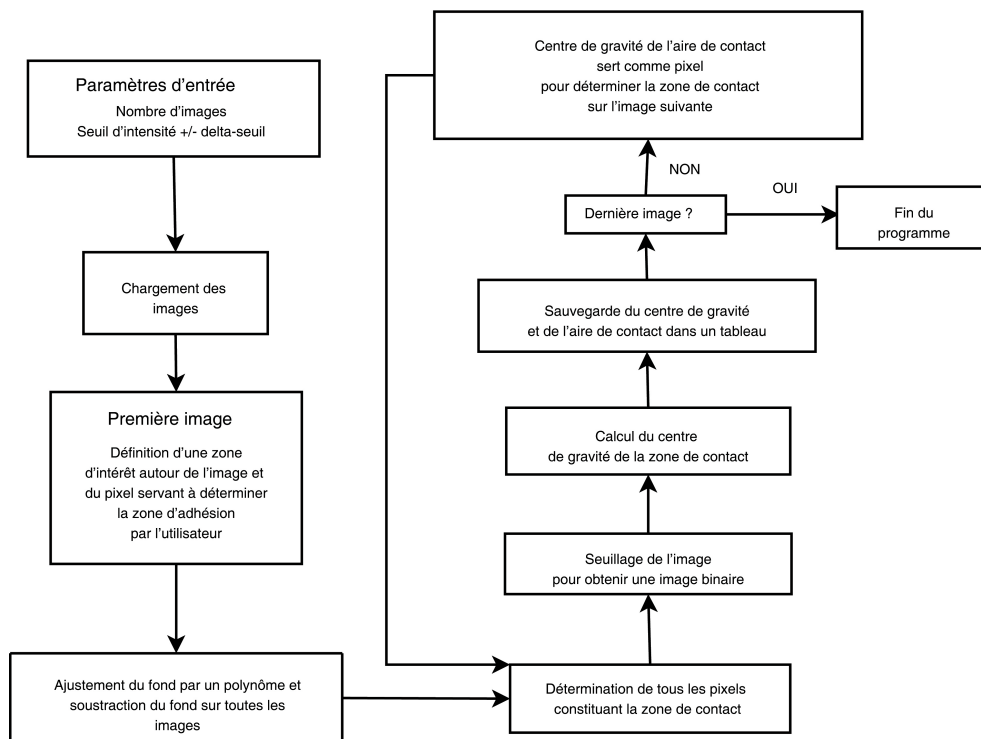


FIG. 7.9 – Algorithme permettant le suivi automatique de l'aire de contact au cours du temps pour une bille recouverte de nickel se déplaçant sur une surface fonctionnalisée en histidine.

La zone de contact est arbitraire ici et est fonction du seuil d'intensité choisi.

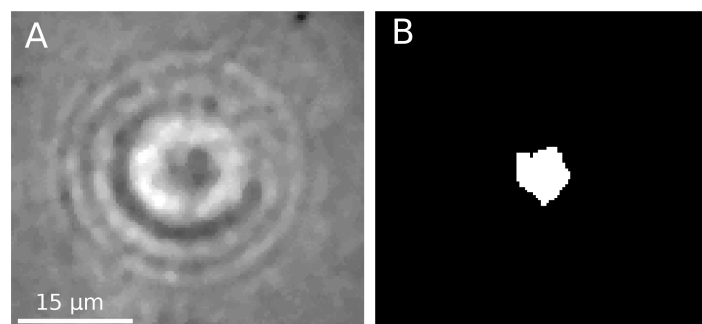


FIG. 7.10 – A : image en RICM d'une bille d'agarose en adhésion. B : détermination de l'aire de la zone d'adhésion de la bille de l'image A.

Une fois la zone d'adhésion définie, nous pouvons calculer son centre, centre qui servira de pixel initial pour la détection de la zone d'adhésion de l'image suivante.

La détermination de la zone de contact dépend beaucoup du seuil et du pixel donné au départ. Une limitation de cette méthode de suivi d'objet est que lors du décollement de l'objet (passage sur un obstacle ou tout simplement car il n'y a plus d'adhésion entre l'objet et la surface) la zone centrale apparaissant en noir disparaît et donc on ne peut plus suivre l'objet. Pour remédier à ce problème et pouvoir suivre l'objet tout au long de son mouvement, nous avons utilisé les franges d'interférences pour déterminer le centre de la bille et pour également calculer la hauteur de la bille par rapport au substrat.

7.3.2 Suivi du centre de gravité de la bille à l'aide des franges d'interférences.

Le principe consiste à intégrer les intensités sur des cercles concentriques de plus en plus grands, dont le centre, le rayon du cercle le plus grand et l'angle d'ouverture du cercle sont choisis par l'utilisateur pour la première image, afin d'obtenir un profil radial d'intensité. Ce profil est déterminé en prenant successivement comme centre les pixels voisins du pixel initial, pixels voisins appartenant à un rectangle centré sur le pixel initial et dont les dimensions sont choisies par l'utilisateur. Pour chaque pixel de départ, nous faisons la somme des erreurs standards des intensités moyennées sur chaque cercle [Schilling et al., 2004] et nous construisons une matrice contenant la somme des erreurs standards. Ensuite, nous effectuons une interpolation de la matrice avec un polynôme à deux variables d'ordre 2 pour déterminer le centre de la bille à une résolution de l'ordre de la cinquantaine de nanomètres. La figure 7.11 nous montre l'algorithme de suivi du centre de la bille à partir des franges d'interférences ainsi qu'un profil radial d'intensité moyenné.

Le profil radial d'intensité nous donne donc accès à la position des franges d'interférences par rapport au centre de la bille. Nous recherchons alors leur position en ajustant le profil d'intensité autour des extrema par un polynôme d'ordre 6. Les positions des franges d'inter-

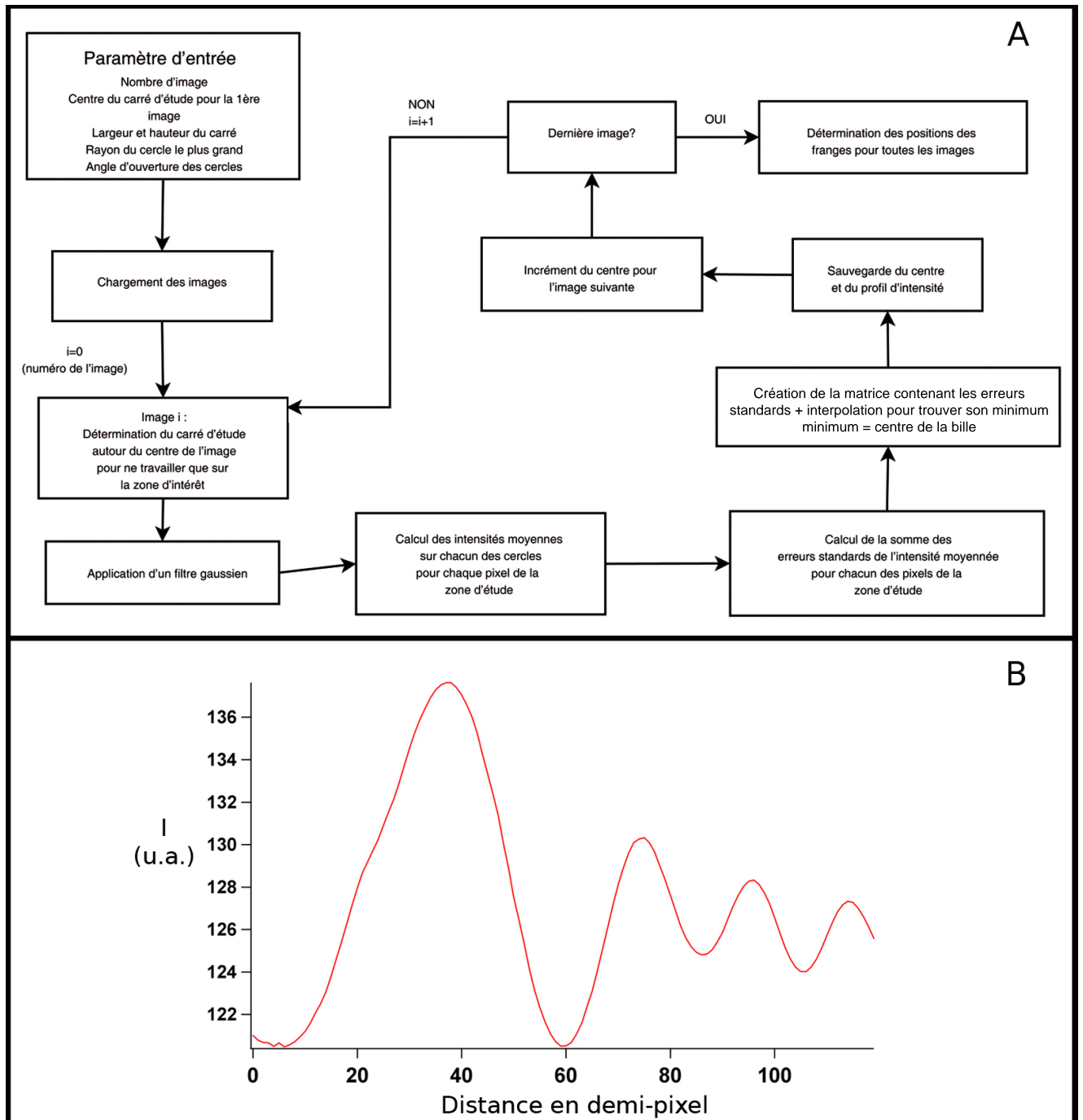


FIG. 7.11 – A : Algorithme permettant de suivre automatiquement le centre de gravité d'une bille observée en RICM à partir des franges d'interférences. B : exemple de profil radial intégré à partir des cercles concentriques.

férences vont nous permettre de déterminer à quelle distance de la surface se trouve la bille lors de son déplacement.

Vésicules en adhésion forte dans un écoulement de cisaillement

Contrairement au cas de vésicules soumises à un écoulement loin d'une paroi, le flux surfacique de vésicules fermement attachées à une paroi dans un cisaillement n'a pas généré beaucoup d'études expérimentales [Cuvelier et al., 2004], [Lorz et al., 2000], bien que la question soit d'intérêt en terme de mobilité et de recrutement des récepteurs membranaires cellulaires dans la zone de contact.

Pour des objets en adhésion forte, on sait que dans le cas d'une goutte déformée, une recirculation du fluide est possible à l'intérieur de l'objet [Dimitrakopoulos and Higdon, 1998]. Mais, qu'en est-il pour des vésicules dont la membrane est incompressible sans échange de matières entre l'intérieur et la membrane ? Quelles sont les caractéristiques des lignes de courants pour une vésicule en adhésion forte, induite par une reconnaissance spécifique de type ligand/récepteur ou par une adhésion non-spécifique ? Comment ces caractéristiques varient avec le cisaillement, la force d'adhésion et la taille des objets ?

8.1 Conditions expérimentales

Afin de mettre des vésicules en adhésion forte, nous avons utilisé deux types de substrats : un premier substrat greffé d'histidine selon le protocole présenté au chapitre 4 et un second substrat recouvert de polylysine. Après avoir nettoyé des lamelles de verre dans une solution à 14.5 M de NaOH, les substrats sont incubés dans une solution de polylysine (10^{-3} % v/m) pendant 30 minutes puis rincés avec de l'eau ultrapure. Les vésicules ont été préparées à partir d'une solution de DOPC ou d'un mélange DOPC/DOGS-NTA-Ni (95 : 5) selon la méthode d'électroformation classique, avec des concentrations en sucrose de 50 et 200 mM. Enfin, les vésicules sont diluées dans une solution iso-osmolaire en glucose et d'HEPES (10 mM, pH=8).¹

Le tableau 8.1 présente toutes les vésicules étudiées, les substrats sur lesquels elles sont en adhésion ainsi que leurs caractéristiques géométriques.

8.2 Détermination de la forme des vésicules

Nous avons directement observé la projection des vésicules dans leur plan méridien ($z=0$) à l'aide du microscope couché présenté au chapitre 6.2.2. La figure 8.1 nous montre la Ves4 observée en vue de côté ainsi que le mouvement d'un petit défaut. Les formes observées sont stables, ne changeant pas de façon significative lors de l'augmentation du cisaillement.

Les formes des vésicules sont très bien ajustées par une sphère tronquée. Elles sont caractérisées par leur rayon R et la position du substrat ($y=y_s$) relativement au centre de la sphère, qui sera considéré comme l'origine du référentiel. Ainsi, pour les vésicules en vue de côté, la vésicule et son reflet sont ajustés par une sphère. L'intersection des deux nous permet de mesurer la longueur de contact L . Les observations en vue de côté permettent de mesurer directement L pour des vésicules en interaction forte avec le substrat (figure 8.1). La forme complète des vésicules est alors déterminée en considérant que la vésicule est axi-symétrique autour de y .

La projection des vésicules dans leur plan équatorial ($y=0$) est directement obtenue à partir

¹Dans la suite de ce travail, x correspond à la direction du flux et y à la direction de cisaillement (figure 8.1).

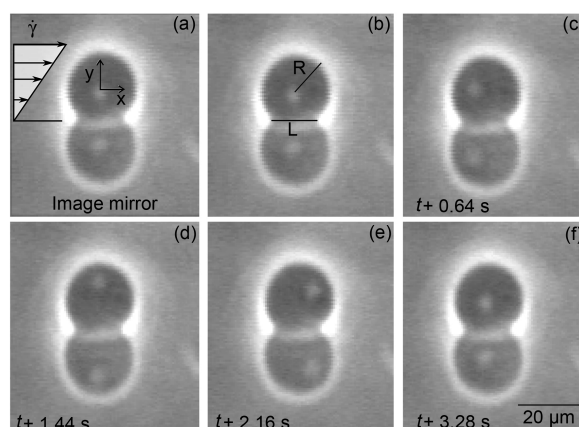


FIG. 8.1 – (a) : Vue de côté de la Ves4 et de sa réflexion sur le substrat, soumise à un écoulement de cisaillement selon la direction x . (b) : L est la longueur de la zone de contact. R est le rayon de la vésicule. De (b) à (f) : un petit défaut lipidique (point clair) permet de suivre le mouvement de la surface. Le bas de l'image correspond à la réflexion de la Ves4 sur le substrat.

d'observations en microscopie optique classique en vue de dessus, ainsi que la mesure du rayon des vésicules (figure 8.2). Afin de déterminer précisément la longueur de la zone de contact, des observations ont été menées simultanément sur des vésicules, en microscopie classique et en RICM (chapitre 6.1.2). Ces observations traduisent une très forte interaction entre les vésicules et la surface par l'intermédiaire d'un très large disque homogène de diamètre L (figure 8.2).

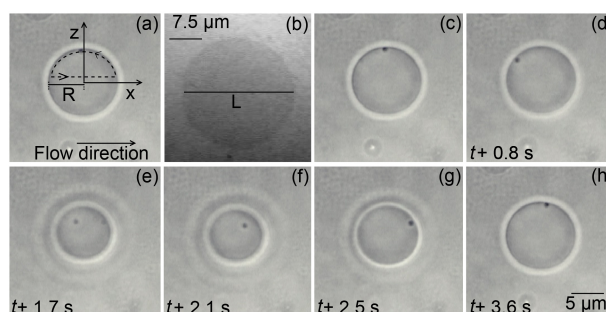


FIG. 8.2 – (a) : Vue de dessus de la Ves5 soumise à un écoulement de cisaillement. La ligne pointillée représente la projection de la trajectoire du défaut. (b) : Vue en RICM de la Ves5. (L'échelle est la même pour les images, (a) et de (c) à (h)). La zone d'adhésion est le large disque homogène noir. (c), (d) et (h) : le défaut (point noir) évite la zone de contact quand il s'approche de la surface. De (e) à (g), le traceur circule sur le haut de la vésicule (la focalisation change).

On n'observe aucune frange d'interférence sur les bords de la vésicule en raison d'une

augmentation importante de la pente de la membrane par rapport au substrat. Par ailleurs, les observations dans le plan horizontal ($\gamma = \text{constante}$) ne permettent pas une détermination complète de la forme des vésicules puisque l'axe de symétrie des vésicules est perpendiculaire au plan d'observation. A partir des observations en vue de côté, nous considérons que les vésicules observées en vue de dessus sont aussi des sphères tronquées.

Vésicule n°	R (μm)	L/2R	Substrat
Ves1	11.0	0.46	Histidine
Ves2	11.0	0.89	Histidine
Ves3	17.5	0.90	Histidine
Ves4	10.9	0.74	Histidine
Ves5	18.4	0.96	Polylysine
Ves6	9.4	1.0	Polylysine
Ves7	11.4	0.98	Polylysine

TAB. 8.1 – Paramètres expérimentaux des vésicules étudiées. L est le diamètre de l'aire de contact et R le rayon des vésicules.

Les vésicules présentent de larges zones de contact avec des rapports $L/2R$ allant de 0.46 à 1 (1 caractérisant une forme de demi-sphère). Comme les vésicules sont diluées dans une solution de même osmolarité que leur solution interne, elles sont bien gonflées et sphériques. La littérature nous indique que des vésicules en adhésion sur un substrat ouvrent temporairement quelques pores pour expulser une partie de leur solution interne afin de relâcher les tensions s'exerçant sur la membrane [Lipowsky and Seifert, 1991]. La forme de ces vésicules consiste en un large disque pour l'aire de contact, une capsule sphérique au-dessus ainsi qu'une petite région intermédiaire avec une forte courbure le long de la ligne de contact, ce qui traduit une grande énergie d'adhésion avec la surface [Sandre et al., 1999].

8.3 Observation de l'écoulement de surface

Nous avons suivi le mouvement de petits défauts lipidiques accrochés à la membrane (d'une taille approximative de $1 \mu\text{m}$) dans un écoulement de cisaillement. Nous avons choisi des défauts associés à la partie interne de la membrane (8.3) qui doivent circuler sur la partie intérieure de la membrane même si celle-ci se trouve très proche du substrat. Ce suivi de défaut est réalisé soit par un programme écrit en IDL soit à la main avec ImageJ selon le contraste du défaut.

Les mouvements de ces défauts permettent de visualiser la projection du mouvement de surface. Les séquences des figures 8.1 et 8.2 démontrent clairement l'existence de flux de surface sur la membrane [Lorz et al., 2000] et [Cuvelier et al., 2004]. La projection des orbites décrites par les défauts sur la surface des vésicules est déterminée en mesurant leur position en fonction du temps (figure 8.1) et en assumant qu'elles correspondent aux lignes de courant surfaciques de la membrane. On considère que le mouvement brownien d'un petit défaut est suffisamment lent comparé à sa vitesse de circulation pour ne pas perturber la détermination des lignes de courant. Mais sur des échelles de temps plus longues, le défaut

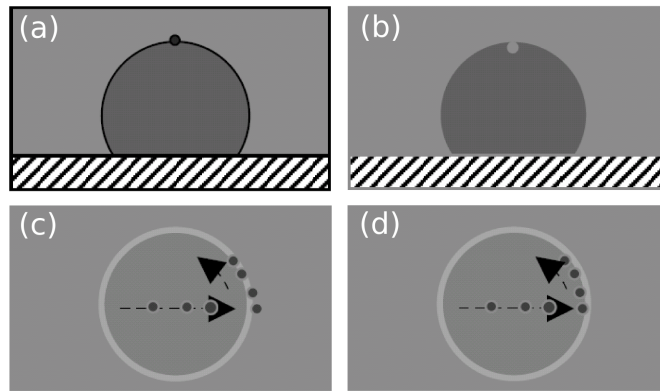


FIG. 8.3 – Schéma expliquant la sélection des vésicules présentant des défauts internes. Pour les vésicules observées en vue de côté (a) et (b), nous avons choisi des défauts qui apparaissent moins contrastés (b) que la vésicule. Nous interprétons cette différence de contraste par le fait que le défaut est peut-être une invagination (l’invagination membranaire correspond au repliement de la membrane sur elle-même) de la membrane. Pour les vésicules observées en vue de dessus (c) et (d), nous avons choisi celles dont la projection du défaut est toujours localisée dans la vésicule (d).

diffuse doucement et peut alors explorer plusieurs lignes de courant. Ainsi, l’observation du déplacement d’un seul défaut nous permet d’observer plusieurs orbites sur une même vésicule. La séquence de la figure 8.2 montre que lorsque le défaut passe au sommet de la vésicule ($x=0$), son orbite est quasiment circulaire et se déroule dans un plan ($z = \text{constante}$) parallèle au plan de cisaillement. Quand le défaut s’approche de la surface, sa trajectoire s’écarte du plan et évite la zone de contact, cette zone étant considérée comme fixe.

8.4 Détermination des lignes de courant de surface

Les lignes de courant de chacune des vésicules sont obtenues à partir de l’observation d’un seul défaut. Les coordonnées (x, y) et (x, z) sont directement mesurées à partir de la vue de côté (projection dans le plan $z=0$) et de la vue classique de dessus (projection dans le plan $y=0$). La troisième coordonnée est calculée en considérant que les vésicules sont des sphères tronquées d’équation $x^2 + y^2 + z^2 = R^2$ et $y > y_s$. Les projections des lignes de courant sont présentées pour trois vésicules dans les trois plans (x, y) , (x, z) et (z, y) sur la figure 8.4.

Les vésicules présentent différents rapports d’aspects caractérisés par le ratio $L/2R$. Des lignes de courant typiques sont illustrées sur la figure 8.4. Un premier point à noter est que le flux surfacique est divisé en deux quadrants symétriques de chaque côté du plan $z = 0$. Le défaut, se déplaçant le long de la zone méridienne, a changé de côté lors de son observation, comme nous pouvons le voir sur la figure 8.4c. Un second point concerne la présence de deux points de stagnation, un pour chaque côté de la vésicule. Comme les vésicules ne sont pas sphériques, l’axe z n’est pas un axe de symétrie et les points de stagnation ne sont pas localisés sur cet axe, contrairement à ce qui peut être observé pour des vésicules sphériques en

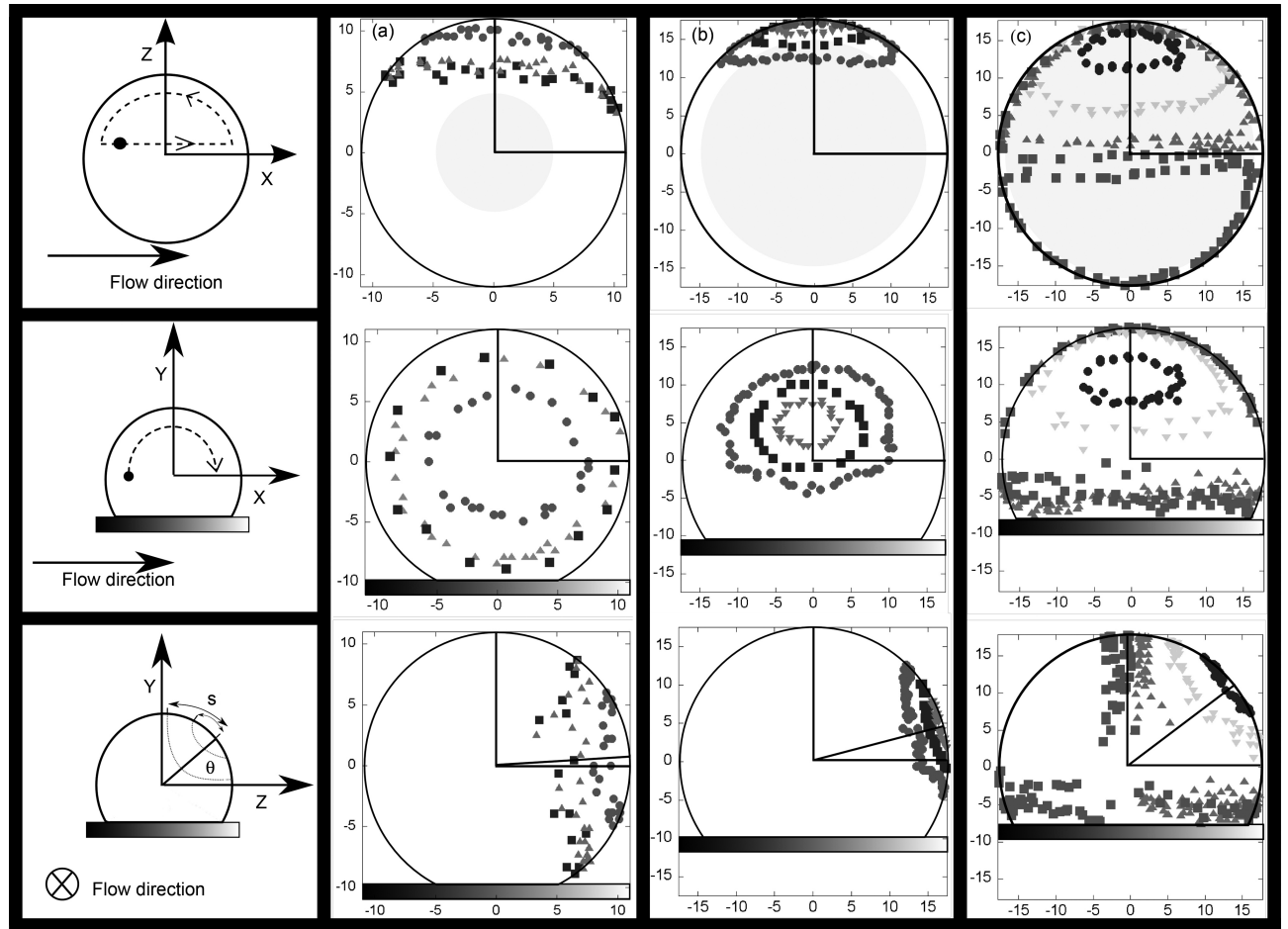


FIG. 8.4 – Trajectoire du traceur et reconstruction des lignes de courant pour 3 vésicules. Projection dans le plan (x,y) de la trajectoire du défaut observé en vue de côté et reconstruction des lignes de courant dans les plans (z,y) et (x,z) : (a) : Ves1 ; (b) : Ves3. Projection dans le plan (x,z) de la trajectoire du défaut observé en vue de dessus et reconstruction des lignes de courant dans les plans (z,y) et (x,y) : (c) : Ves5. Le disque gris dans la vue en (x,z) représente la zone de contact.

glissement sur un plan incliné ([Abkarian et al., 2001]). La position des points de stagnation (SP) est repérée dans le plan $x = 0$ par l'angle θ , angle entre le rayon de la sphère passant par le point de stagnation et l'axe des z (figure 8.4). La variation du point de stagnation en fonction du rapport d'aspect $L/2R$ est présentée sur la figure 8.5.

L'angle θ a une valeur nulle pour une vésicule symétrique sphérique et augmente avec le rapport $L/2R$. L'augmentation est plus forte lorsque $L/2R$ approche de 1 (pour une demi-sphère). Nous n'avons jamais observé de vésicules présentant un rapport d'aspect $L/2R$ supérieur à 1 (la vésicule aurait un angle de contact avec le substrat supérieur à 90°). En effet, ce type de vésicule serait très probablement instable à cause de la grande énergie de courbure de la membrane au contact de la surface.

Lorsque la taille de la zone de contact augmente, les orbites des lignes de courant s'éloignent

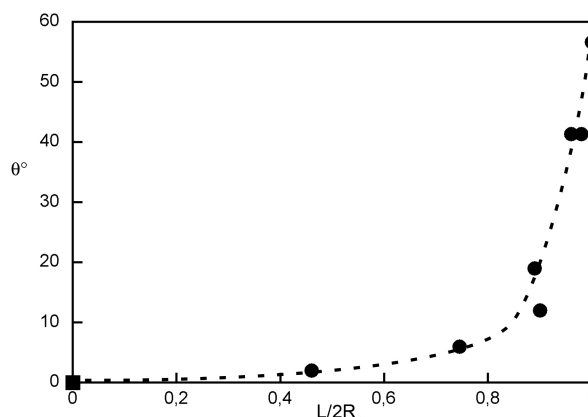


FIG. 8.5 – Variation de l'angle θ en fonction du rapport d'aspect $L/2R$. La ligne pointillée est un guide pour les yeux.

de plus en plus d'orbites circulaires planes car aucune possibilité de flux n'est allouée aux lipides dans la zone de contact. Les lignes de courant présentent des formes non planaires, peu triviales et difficilement caractérisables.

8.5 Vitesses angulaires

La période T de révolution d'un défaut sur une orbite a été mesurée expérimentalement en suivant la projection des trajectoires du défaut sur une orbite complète. Un exemple de la variation des coordonnées x et y en fonction du temps est présenté sur la figure 8.6.

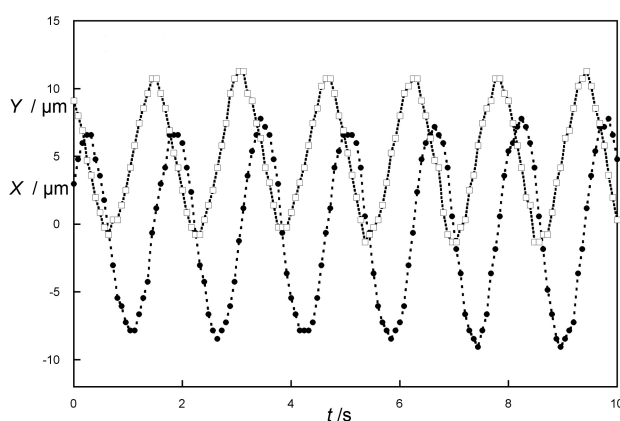


FIG. 8.6 – Evolution typique des coordonnées x (cercles noirs) et y (carrés blancs) d'un défaut mesuré à partir de la vue de côté sur la Ves3. Les lignes sont des guides pour les yeux.

Ces variations sont très bien ajustées par une fonction sinusoïdale. Cet ajustement indique que la vitesse de rotation est constante et égale à la fréquence de révolution $\omega = 2\pi/T$.

Une variation typique de ω sur une même orbite en fonction du cisaillement, $\dot{\gamma}$, est présentée sur la figure 8.7. Nous pouvons ainsi remarquer que la vitesse ω varie linéairement avec le taux de cisaillement, variation prédite dans le cas de vésicules non adhérentes dans un cisaillement [Kraus et al., 1996] et observée pour des vésicules non-adhérentes se déplaçant près d'une paroi [Abkarian and Viallat, 2005], [Abkarian et al., 2002], [Razpet et al., 2000]. De plus, pour un taux de cisaillement donné, la valeur de ω augmente lorsque la zone de contact décroît, c'est-à-dire quand le rapport $L/2R$ diminue. Enfin, la vitesse de rotation d'une ligne de courant dépend de sa position latérale sur la vésicule. Pour illustrer ce phénomène, nous avons mesuré la vitesse de rotation de différentes lignes de courant pour une même vésicule. La position latérale d'une ligne de courant est caractérisée dans le plan médian de la vésicule ($x = 0$) par le rapport $s^* = s/s_0$, de la distance curviligne entre le point de stagnation et la ligne de courant s sur la distance curviligne entre le point de stagnation et le sommet de la vésicule ($x = 0, y = R, z = 0$), s_0 (figure 8.4). La figure 8.8 présente quant à elle la variation de la vitesse de rotation renormalisée par le taux de cisaillement, $\omega/\dot{\gamma}$ en fonction de s^* , pour les vésicules observées en vues de dessus et de côté. Les vitesses sont grandes lorsque l'on se trouve proche des points de stagnation (SP). Cette variation est contraire aux prédictions de Kraus et coll. [Kraus et al., 1996] pour des vésicules se déplaçant dans un cisaillement sans effet de paroi, où les vésicules présentent une vitesse angulaire plus faible vers les SP. Une interprétation de ce résultat inattendu peut reposer sur le fait que la zone de contact est figée et ne bouge pas. Il s'ensuit alors que les vitesses angulaires des orbites à proximité de la ligne de contact doivent être petites afin de limiter les dissipations visqueuses dans la membrane. Les différences de vitesses angulaires sur diverses lignes de courant révèlent un fort cisaillement dans la membrane, puisque deux éléments latéraux adjacents de la membrane ne restent pas adjacents après une révolution complète. On peut aussi noter que le rapport $\omega/\dot{\gamma}$ est plus grand que 0.5 pour une ligne de courant proche de SP (également observé par Razpet et coll. [Razpet et al., 2000]), valeur de la vitesse angulaire d'un fluide rigide dans un cisaillement loin d'une paroi.

Nous extrapolons les deux valeurs extrêmes de la vitesse angulaire, ω_0 au sommet de la vésicule, et ω_θ au SP, en ajustant les variations de la vitesse angulaire par une fonction linéaire arbitraire, $\omega/\dot{\gamma} = (\omega_0 - \omega_\theta)s^* + \omega_\theta$ comme nous le voyons sur la figure 8.8. La quantité $\omega_0 - \omega_\theta$ représente le gradient de vitesse le long d'un déplacement curvilinéaire sur la membrane de la vésicule. Ces trois quantités sont tracées en fonction du rapport d'aspect, $L/2R$, sur la figure 8.9.

Il apparaît clairement que $\omega/\dot{\gamma}$ est principalement déterminé par le rapport d'aspect de la vésicule $L/2R$ et dépend peu de la taille de la vésicule dans la gamme de rayon étudiée. $\omega/\dot{\gamma}$ est constant tant que $L/2R \leq 0.8$. Pour des zones de contact plus importantes, la vitesse décroît fortement et présente une faible différence entre le sommet et le SP.

8.6 Discussion

Nous avons décrit les observations du flux de surface d'une vésicule adhérent sur une surface. Nous avons révélé l'existence d'un flux rapide sur la surface, flux caractérisé par des orbites non planaires autour de deux points de stagnation de chaque côté de la vésicule. Nous avons aussi montré qu'il était peu probable qu'un flux se produise dans la zone d'adhésion,

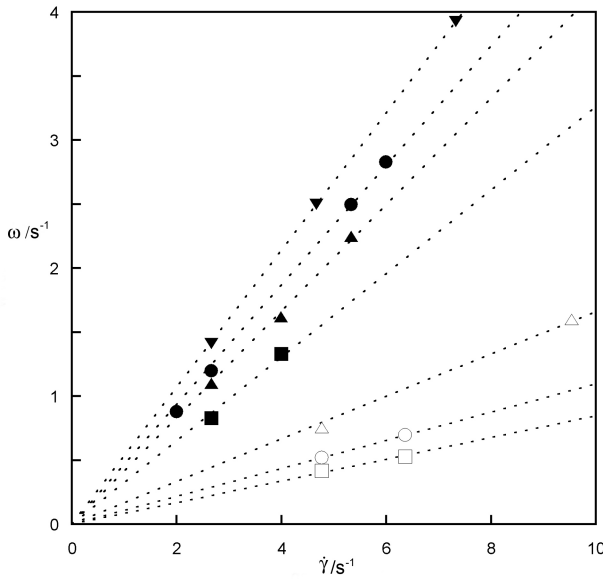


FIG. 8.7 – Variation linéaire de la vitesse angulaire ω d'un défaut en fonction du taux de cisaillement $\dot{\gamma}$ observé sur des orbites fixes : \bullet : Ves1 ; \blacksquare : Ves2 ; \blacktriangle : Ves3 ; \blacktriangledown : Ves4 ; \circ : Ves5 ; \square : Ves6 et \triangle : Ves7. Les lignes pointillées sont des régressions linéaires.

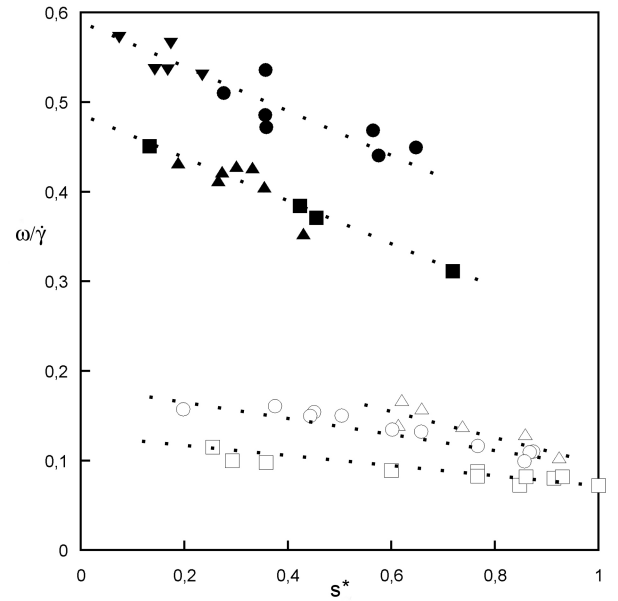


FIG. 8.8 – Variation de la vitesse angulaire réduite $\omega/\dot{\gamma}$ pour un traceur en fonction de la distance curvilinéaire adimensionnée $s^* = s/s_0$. \bullet : Ves1 ; \blacksquare : Ves2 ; \blacktriangle : Ves3 ; \blacktriangledown : Ves4 ; \circ : Ves5 ; \square : Ves6 et \triangle : Ves7. $\dot{\gamma}$ varie entre 1.13 et 11 s⁻¹.

cela signifiant que les lipides ne doivent pas se détacher et se rattacher à la fréquence de rotation de la membrane. Par ailleurs, il est important de souligner que la nature du contact et donc de la dissipation peut être différente pour l'adhésion spécifique et non-spécifique. Alors que l'adhésion non-spécifique va créer une zone de contact homogène où tous les lipides seront soumis au même champ d'interaction avec le substrat, l'adhésion spécifique implique des domaines d'adhésion entre les lipides nickels et les groupements d'histidines, séparés par des zones non-adhésives ou bien par des zones contenant uniquement des lipides DOPC. Ces lipides peuvent se déplacer autour des lipides attachés, bien qu'un tel mouvement ait un coût important en terme d'énergie de dissipation visqueuse [Sandre et al., 1999]. L'observation d'un mouvement local de lipides nécessite des instruments plus sophistiqués tels que du FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching). En outre, la zone d'adhésion joue le rôle d'un obstacle pour le flux de la membrane, ce qui induit un gradient de vitesse. En effet, la vitesse angulaire sur les orbites augmente lorsque les orbites se rapprochent du point de stagnation, ce qui démontre une forte dissipation de cisaillement dans la membrane. Il n'existe actuellement aucune description théorique, analytique ou numérique capable de décrire la forme des lignes de courant et la dissipation visqueuse totale de la membrane. Des questions similaires ont été étudiées pour des gouttes en adhésion sur un substrat, [Dimitrakopoulos and Higdon, 1997], [Dimitrakopoulos and Higdon, 1998] mais les lignes de courant associées sont différentes de celles observées sur les vésicules. En

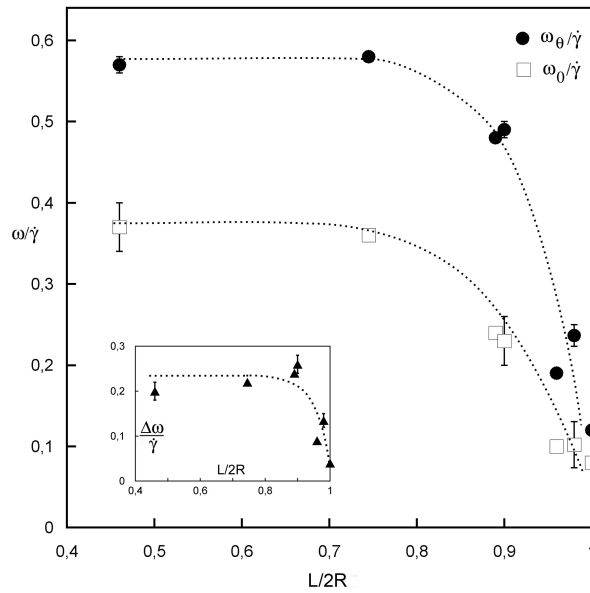


FIG. 8.9 – Variation de la vitesse angulaire réduite extrapolée au point de stagnation, $\omega_\theta/\dot{\gamma}$, et au sommet de la vésicule $\omega_0/\dot{\gamma}$, en fonction du rapport d'aspect $L/2R$. Encadré : variation du gradient de la vitesse angulaire normalisé en fonction de $L/2R$. Les courbes en pointillées sont des guides pour les yeux.

effet, dans le cas des gouttes, la recirculation des molécules à l'intérieur de la goutte est autorisée (figure 8.10) alors que les lipides ne peuvent entrer dans la partie interne des vésicules, ce qui en d'autres termes signifie que la divergence surfacique de la vitesse surfacique doit être égale à zéro dans le cas d'une vésicule.

Dans le cas d'une cellule, un cytosquelette est accroché fermement à la membrane via des protéines transmembranaires. Ainsi, aucun flux ne semble pouvoir se produire sur la surface. En effet, des expériences en vue de côté, menées sur des CHO adhérant à une surface, ont montré que de petites hétérogénéités sur les CHO n'ont aucun mouvement lors de l'application d'un cisaillement hydrodynamique. Cependant, un petit mouvement lipidique peut exister autour des protéines transmembranaires associé à une forte dissipation visqueuse comme cela fut observé en tirant un fil en dehors de la cellule [Brochard-Wyart et al., 2006]. La diminution de $\omega/\dot{\gamma}$ avec la force d'adhésion caractérisée par $L/2R$, peut avoir plusieurs origines :

- i) plus la zone d'adhésion est grande, plus le flux membranaire est gêné par cet obstacle
- ii) la déviation de la forme parfaitement sphérique a tendance à faire décroître le rapport $\omega/\dot{\gamma}$ en partant des théories décrivant la dynamique d'une vésicule dans un écoulement de cisaillement [Keller and Skalak, 1982], [Secomb and Skalak, 1982], [Kraus et al., 1996].

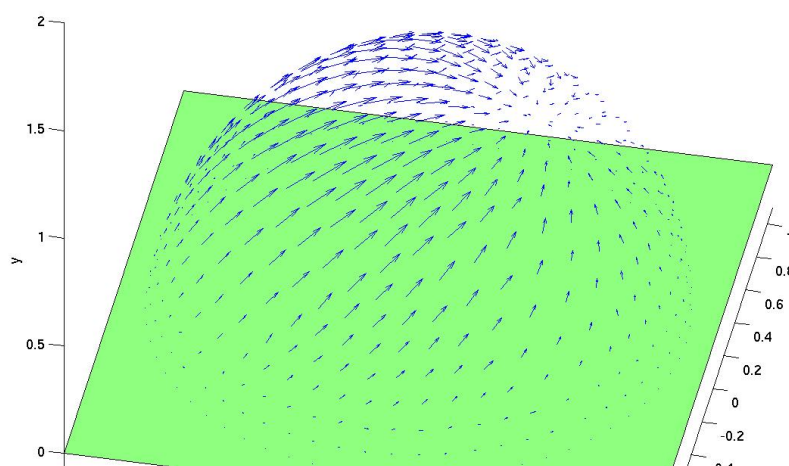


FIG. 8.10 – Lignes de courant d'une goutte en adhésion sur un substrat soumise à un écoulement de cisaillement. Les flèches représentent le champ des vitesses des lignes de courant. (Pozrikidis : communication personnelle)

Chapitre 9

Vésicules et billes en adhésion faible sous écoulement

Dans le cas d'objets en adhésion faible (l'adhésion pouvant être médiée par seule liaison), les mouvements des objets ont été étudiés expérimentalement pour des billes et des cellules [Kaplansky et al., 1993], [Alon et al., 1995], [Greenberg et al., 2000] afin de déterminer les caractéristiques de l'interaction (mesure de la durée de vie de la liaison, paysage énergétique ...). Ici les questions que l'on se pose portent non pas sur les caractéristiques de l'interaction ligand/récepteur mais sur la dynamique de l'objet : quels régimes de mouvement peuvent être obtenus, quels sont les effets du taux de cisaillement, du rayon de l'objet, du nombre de récepteurs, de la distance à la paroi, du glissement ou du roulement sur les régimes de mouvement ? Dans quelle mesure l'effet de la force de portance quand l'objet n'est pas parfaitement sphérique influe sur le mouvement ?

Ces questions vont être abordées brièvement sur des vésicules car on n'a pas pu rendre contrôlable l'interaction et ensuite sur des billes d'agarose où on a joué sur 3 paramètres suivant : le rayon, R , le cisaillement, $\dot{\gamma}$, et le nombre de récepteurs via la concentration en imidazole. Dans un premier temps, on s'attardera sur quelques déplacements typiques de vésicules en adhésion. Puis, on s'intéressera aux billes d'agarose décorées avec du nickel. On est parvenu à contrôler leur adhésion et à observer des déplacements en adhésion.

Dans la suite, les symboles $[\]$ font référence à la concentration molaire de l'espèce considérée.

9.1 Adhésion faible de vésicules : mouvements sans adhésion et en présence d'adhésion

On a caractérisé les comportements de vésicules déformables sous écoulement et en présence d'adhésion. Bien que cela ne concerne qu'une faible proportion de vésicules, on présente ici les résultats saillants.

9.1.1 Conditions expérimentales

Les vésicules ont été électroformées avec une solution de 8 :2 ou 9.5 :0.5 de DOPC : DOGS-NTA-Ni dans une solution de sucrose. Diverses concentrations de sucrose ont été utilisées : 80 mM, 100mM, 110 mM, 200 mM ou 300 mM dont les densités sont respectivement égales à 100.8, 100.9, 101.8, 102.4, 103.8 g/l [Lide, 2005]. Le fluide d'écoulement était composé d'une solution contenant du glucose à même osmolarité que la solution de sucrose servant à l'électroformation et de l'HEPES à 10mM, le tout à un pH de 7.9. Les vésicules sont injectées sur une surface recouverte d'histidines, la surface étant fonctionnalisée avec le protocole 1. Le tableau 9.1 présente les vésicules étudiées et les paramètres des expériences. Seule la vésicule n°6 a été préparée avec la solution de 9.5 :0.5 de DOPC :DOGS-NTA-Ni. Le cisaillement a été varié de 0.4 à 7.1 s⁻¹.

On laisse les vésicules sédimenter pendant 5 minutes sur la surface, puis on attend une dizaine de minutes avant d'appliquer le flux. Les vésicules sont observées en vue de côté (6.2.2) avec un grossissement de 20x1.5 (un pixel a une taille de 0.8 μm). Les films sont enregistrés à une fréquence de 1 à 10 images par seconde.

N°	R (μm)	P (pN)	$\Delta\rho g$ (Pa/m)
1	8.5	0.14	52.9
2	16.5	2.27	120.6
3	17.9	2.89	120.6
4	25.6	8.48	120.6
5	6.6	0.14	120.6
6	8.5	0.45	176.6
7	10.2	0.28	63.7
8	7.2	0.08	52.9
9	7.4	0.09	52.9
10	16.0	1.09	63.7
11	10.5	0.59	120.6
12	11.5	0.77	120.6
13	9.4	0.22	64.2
14	24.5	7.47	120.6

TAB. 9.1 – Paramètres des vésicules. R est le rayon des vésicules, P est le poids des vésicules, $\Delta\rho$ est la différence de densité entre le fluide interne et le fluide externe, g est l'accélération gravitationnelle.

9.1.2 Observations

Les vésicules sont observées pendant 20 à 200 secondes selon le cisaillement appliqué. Les distances parcourues par les vésicules vont de la centaine de microns au millimètre selon l'état d'adhésion de l'objet et la valeur du taux de cisaillement. La présence de petits défauts lipidiques sur la surface des vésicules permet d'observer un mouvement de *chenille de char* des vésicules pendant leur déplacement. La position du centre de gravité de l'objet est pointée à l'aide du logiciel ImageJ. Lors du déplacement des vésicules nous n'avons observé aucune déformation. On a mis en évidence la présence de trois régimes : un premier régime à vitesse constante, la vitesse augmentant avec l'augmentation du cisaillement ; un deuxième régime de saltation où le mouvement à vitesse constante de l'objet est entrecoupé d'arrêts (la vitesse de l'objet est alors nulle) ; et enfin un troisième régime : des régimes de déplacement en adhésion.

9.1.3 Cas des vésicules à vitesse constante

A partir de la détermination de la position du centre de gravité des vésicules, on calcule par un ajustement linéaire la vitesse de translation des vésicules. A l'aide de l'équation de Goldman (equation 2.28) on calcule alors la distance h séparant la vésicule de la surface. Cette analyse concerne les vésicules 1 à 7 (9.1). La figure 9.1 montre des déplacements à vitesse constante de la vésicule 6 pour différents taux de cisaillement.

Les vésicules pouvant décoller à cause de poussières se trouvant sur la surface, on n'a pris en compte dans la suite que la plus petite vitesse de translation mesurée pour calculer

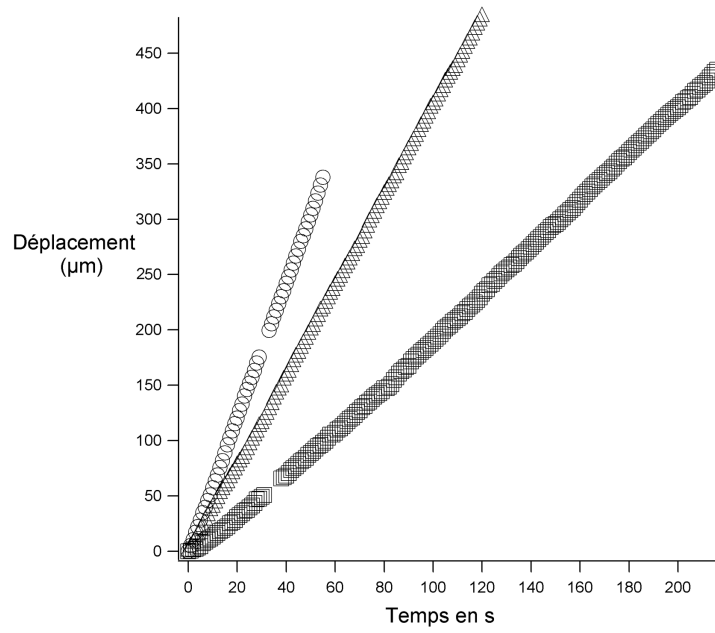


FIG. 9.1 - Déplacement linéaire de la vésicule 6. \square : $\dot{\gamma} = 0.4 \text{ s}^{-1}$, \triangle : $\dot{\gamma} = 0.66 \text{ s}^{-1}$ et \circ : $\dot{\gamma} = 0.93 \text{ s}^{-1}$.

la distance séparant les vésicules de la surface. La figure 9.2 (a) montre un histogramme des hauteurs séparant les vésicules 1 à 6 de la surface. La figure 9.2 (b) montre la variation du

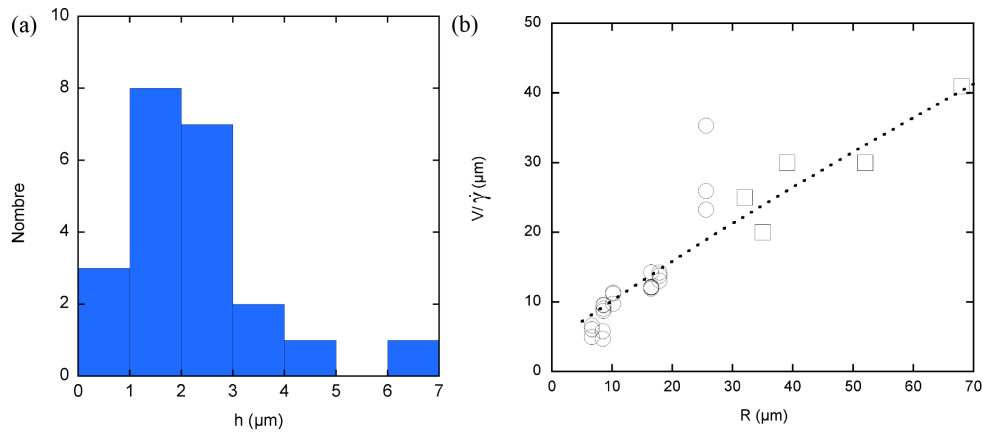


FIG. 9.2 - (a) : Histogramme des hauteurs calculées pour les vésicules 1 à 7 à partir de la mesure des vitesses de déplacement. (b) : pour les vésicules 1 à 7. Les \square sont tirés du papier [Abkarian and Viallat, 2005]. Les pointillés représentent l'équation de Goldman 2.28 pour une hauteur de $2.4 \text{ } \mu\text{m}$.

rapport $V/\dot{\gamma}$ en fonction du rayon pour les vésicules 1 à 7. La majorité des points se situent sur la courbe de Goldman tracée pour $h = 2.4 \text{ } \mu\text{m}$. Ces points se situent sur la courbe publiée

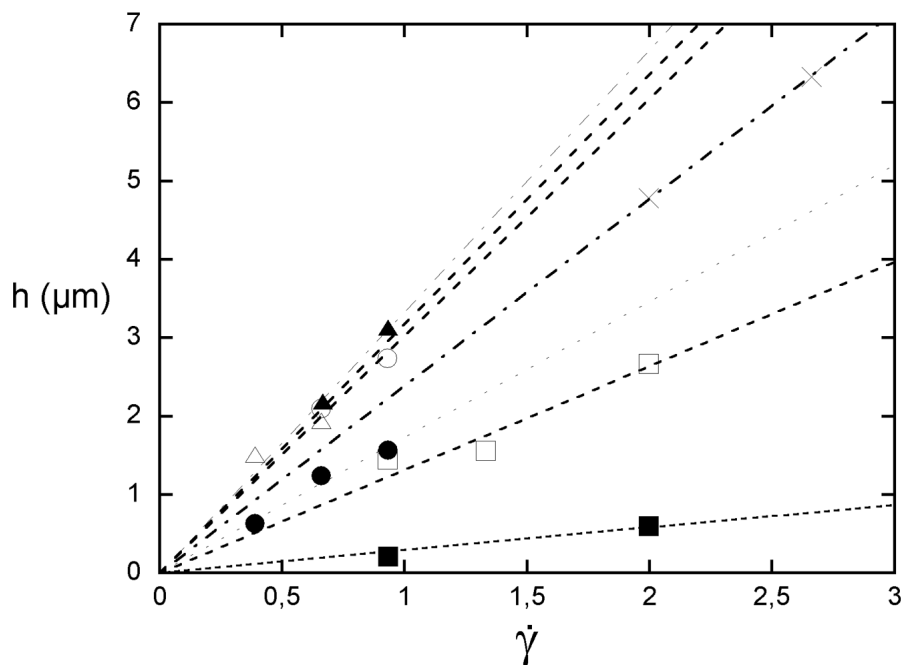


FIG. 9.3 – Variation de la hauteur séparant les vésicules de la surface en fonction du taux de cisaillement appliqué. Les pointillés sont des ajustements linéaires. o : vésicule 1, □ : vésicule 2, △ : vésicule 3, X : vésicule 4, ● : vésicule 5, ■ : vésicule 6, ▲ : vésicule 7.

par Abkarian et Viallat [Abkarian and Viallat, 2005] pour des vésicules non adhésives. Les points qui sortent de la courbe pour un rayon de $25.6 \mu\text{m}$ correspondent à la vésicule 4. Nos observations en accord avec Abkarian et Viallat suggèrent donc que les vésicules qui présentent une vitesse constante ne sont pas en adhésion. Ces résultats posent la question de la valeur de $2.4 \mu\text{m}$ pour h . Quelle est l'origine des forces qui fixent la hauteur des vésicules pendant leur déplacements. Trois hypothèses sont envisageables : i) les fluctuations de la membrane des vésicules induisent une répulsion entropique fixant les vésicules à une hauteur de l'ordre du micron, ii) une force à longue portée repousse les vésicules, iii) les vésicules sont légèrement déformées par le flux ce qui induit une force de portance éloignant les vésicules de la surface. Afin d'apporter des éléments de réponse, on a tracé la variation de la hauteur en fonction du taux de cisaillement : figure 9.3.

On observe une variation linéaire de la hauteur avec le taux de cisaillement. Cet effet nous semble incompatible avec l'hypothèse i) : on s'attend à ce que l'augmentation de la contrainte hydrodynamique entraîne une augmentation de la tension des vésicules et donc une diminution de l'amplitude des fluctuations thermiques de la membrane. Cet effet élimine aussi l'hypothèse ii).

En revanche, la variation linéaire de h avec le taux de cisaillement est celle observée par la force de portance [Abkarian and Viallat, 2005]. En effet, pour une vésicule donnée, le poids P de la vésicule équilibre la force de portance en régime stationnaire, fixant ainsi la hauteur h . Abkarian et coll ont montré que $P = \text{Force portance} = \dot{\gamma} / h \eta R^3 f(v)$, soit à P donné,

$\dot{\gamma} \propto h$.

La hauteur h est donc fixée par la balance entre le poids de la vésicule et la force de portance (qui décroît en $1/h$). A partir des données sur les vésicules, on peut calculer la force renormalisée $P.h/\eta\dot{\gamma}R^3$ qui ne dépend que du taux de dégonflement et estimer ainsi le taux de dégonflement des vésicules 1 à 7 à partir de la loi donnée par Abkarian et Viallat. Les résultats sont reportés dans le tableau 9.2. La détermination de ν à partir de l'observation directe des vésicules sous écoulement est difficile : on ne peut déterminer ν à partir de la projection des vésicules que si celles ci sont axisymétriques, ce qui n'est pas le cas à proximité d'une paroi sous écoulement. Les valeurs de ν estimées (entre 0.92 et 1) sont bien compatibles avec des vésicules faiblement dégonflées (préparées dans une solution isoosmolaire).

N°	$h/\dot{\gamma}$ μms^{-1}	$\frac{Ph}{\eta\dot{\gamma}R^3}$
1	3.02	0.67
2	1.32	0.66
3	3.18	1.60
4	2.38	1.20
5	1.73	0.87
6	0.28	0.21
7	0.34	0.09

TAB. 9.2 – Force de portance renormalisée pour les vésicules 1 à 7.

Cette force de portance montre (d'après [Abkarian and Viallat, 2005]) que nos vésicules ont un taux de dégonflement compris entre 0.92 et 1.

En conclusion, les vésicules circulant à vitesse constante sont non adhérentes, leur distance au substrat, en général de l'ordre du micron est fixée par la balance entre leur poids et la force de portance hydrodynamique. Cette dernière peut atteindre plusieurs pN lorsque la vésicule à un taux de dégonflement de 0.9, montrant ainsi que cette force peut jouer un rôle important s'opposant à la force d'adhésion pour des objets non sphériques sous écoulement.

9.1.4 Cas des vésicules présentant de la saltation

Ce régime particulier de déplacements à vitesse constante entrecoupés de régimes d'adhésion ferme (la vitesse de déplacement est nulle) est caractéristique des vésicules 7, 8, 9, 10, 11 et 12. La figure 9.4 présente des mouvements en saltation pour les vésicules 7 et 10. Comme précédemment, les vitesses sont déterminées par un ajustement linéaire de la courbe de déplacement en fonction du temps.

Pour chaque vésicules, on a mesuré la vitesse de déplacement, V_{avant} , avant l'arrêt ferme de la vésicule et la vitesse de déplacement après l'arrêt : $V_{\text{après}}$. Afin de comparer les résultats les vitesses de déplacements sont renormalisées par le rayon de la vésicule et le cisaillement appliqué. Une approche de type Goldmann nous permet de calculer une hauteur moyenne

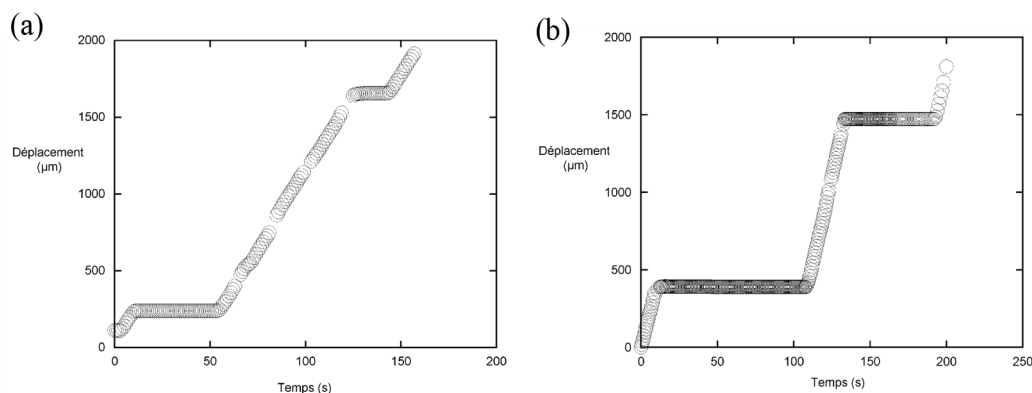


FIG. 9.4 – Déplacement en saut des vésicules 7 (a) et 10 (b). Le cisaillement en (a) est de 1.3 s^{-1} . Le cisaillement en (b) est de 3.3 s^{-1} .

à laquelle les vésicules se trouvent avant et après un arrêt. Ces résultats sont présentés dans le tableau 9.3.

N°	$\dot{\gamma}$ (s^{-1})	$V_{\text{avant}}/\dot{\gamma}R$	$V_{\text{après}}/\dot{\gamma}R$	h_{avant} (μm)	$h_{\text{après}}$ (μm)
7	0.93	1.02	-	2.5	-
8	0.4	-	0.99	-	1.6
8	0.66	1.06	0.59	2	1.5
8	0.93	1.10	0.94	2.1	1.5
9	0.93	0.94	0.66	1.5	0.5
10	0.40	0.75	0.80	1.6	2.1
10	0.40	0.79	0.75	2.0	1.7
10	0.40	0.75	0.76	1.7	1.7
10	0.93	0.94	0.78	3.2	1.9
10	1.33	0.82	0.86	2.1	2.5
10	1.33	0.86	0.89	2.5	2.8
10	1.73	1.0	0.74	3.9	1.6
10	2.27	-	0.82	-	1.6
11	1.33	1.09	1.12	3.1	3.2
11	3.32	1.10	1.05	3.2	2.8
11	3.32	-	1.26	-	4.2
12	0.66	0.74	-	1.1	-

TAB. 9.3 – Tableau regroupant pour les différentes vésicules en saut : le cisaillement appliqué ($\dot{\gamma}$), les vitesses renormalisées avant et après un régime d'adhésion ferme et les hauteurs séparant les vésicules et la surface avant et après un régime d'adhésion ferme.

Les vitesses mesurées avant et après un arrêt sont dans la même gamme que celles mesu-

rées pour des vésicules sans adhésion et présentées précédemment. On obtient un rapport $V_{\text{avant}}/\dot{\gamma}R = 0.91 \pm 0.14$ et un rapport $V_{\text{après}}/\dot{\gamma}R = 0.87 \pm 0.17$.

On ne voit pas de régimes de décélération avant la capture ni d'accélération au décollement. Les vitesses avant et après sont similaires et représentent un état stationnaire d'équilibre (h donné) à l'échelle de temps utilisée (quelques images par seconde).

Une première question est comment la vésicule est capturée à une distance de l'ordre du micron ? L'explication la plus naturelle est d'impliquer les amplitudes de fluctuations de la membrane. Il faut une ondulation de l'ordre du micron rendant possible l'interaction membrane-substrat. L'accroche a eu lieu alors que le centre de gravité de la vésicule n'a pas varié. L'arrêt est suivi de l'affaissement de la vésicule sur le substrat lors de l'étalement de la vésicule, visible par microscopie, bien que difficilement mesurable de manière quantitative. Ce scénario suppose que la membrane présente des ondulations thermiques de l'ordre du micron, et donc que la contrainte hydrodynamique impliquée ne déplie pas les fluctuations thermiques de grande amplitude. Il suppose aussi une force d'adhésion forte, qui contrebalance notamment la force de portance.

La question suivante concerne le décollement : la vitesse augmente rapidement ($t < 1/3$ s) suggérant que tous les liens se cassent simultanément, libérant ainsi la vésicule qui s'éloigne du substrat sous l'effet de la force de portance. On n'observe pas dans le régime de saltation de déplacement de vésicules tant que celles-ci sont adhérentes sur le substrat.

Un autre type de mouvement est aussi observé que l'on décrit dans le paragraphe suivant montrant le déplacement de vésicules sous adhésion.

9.1.5 Cas des vésicules dont le déplacement s'effectue à des vitesses non-constantes

Le 3ème type de comportement observé est illustré sur la figure 9.5. Il est caractérisé par un déplacement de la vésicule avec une vitesse qui varie au cours du mouvement. Ce mouvement est caractéristique des vésicules en adhésion comme on va le montrer et il concerne les vésicules 13, 14, 7 (cette vésicule a aussi des régimes de saltation pour des faibles taux de cisaillement) et 4 (pour des cisaillements supérieurs à 1.33 s^{-1} , la vésicule 4 n'adhère plus et a été incluse dans les régimes à vitesse constante).

La première étape pour analyser le déplacement est de calculer les vitesses. Les vitesses instantanées étant très bruitées, nous avons proposé une méthode d'analyse qui est détaillée en annexe à la fin du chapitre (9.5). Le principe est d'identifier des régimes de déplacement sur lesquels on peut définir une vitesse donnée. Les différents régimes de vitesse sont illustrés par les points rouges dans la figure 9.5. La méthode pour définir un régime de vitesse est d'abord d'estimer une erreur sur la mesure du déplacement puis de déterminer par itérations successives des intervalles de temps sur lesquels le déplacement varie de manière linéaire avec le temps, compte tenu de l'incertitude de la mesure.

Chaque déplacement est alors caractérisé par le temps d'observation, la distance totale parcourue, le nombre de régimes ou le nombre de changement de régimes et les vitesses de chaque régime. Les régimes ont été classifiés en 5 régimes principaux, selon la vitesse de déplacement (V) :

- 1. $V < 0.4$: la vésicule est arrêtée et avance très lentement en adhésion

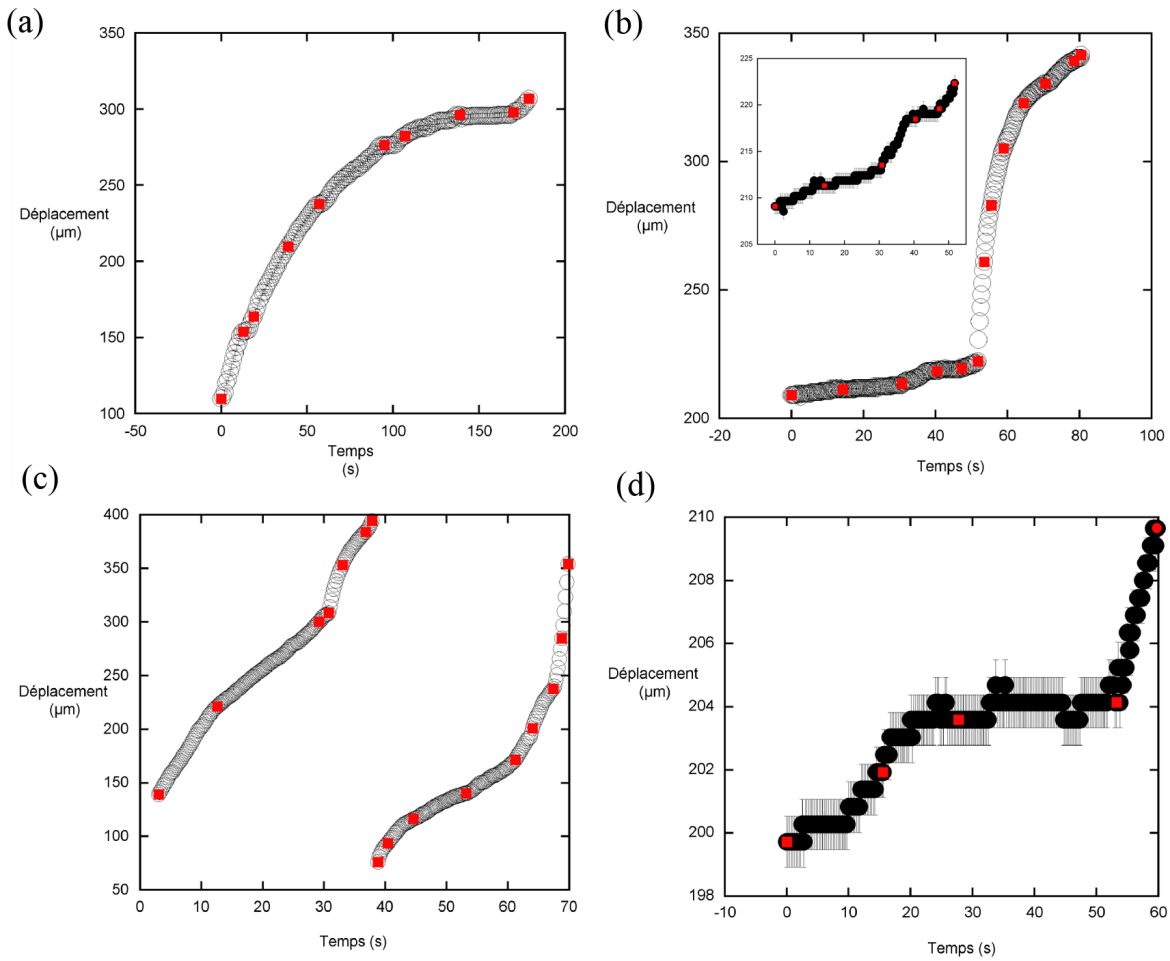


FIG. 9.5 – Déplacements de vésicules en adhésion. Les régimes de déplacements sont décou-
pés en suite de régimes à vitesse constante. Deux points rouges consécutifs délimitent un
régime. (a) : vésicule 4, $\dot{\gamma} = 0.65 \text{ s}^{-1}$. (b) : vésicule 7, $\dot{\gamma} = 4.65 \text{ s}^{-1}$. (c) : vésicule 13, $\dot{\gamma} = 13$
 s^{-1} . (d) : vésicule 7, $\dot{\gamma} = 3.99 \text{ s}^{-1}$.

- 2. $0.4 < V < 1$
- 3. $V > 1$ mais le déplacement se fait sous adhésion
- 4. on regroupe les vitesses où le déplacement s'effectue sans adhésion.

On présente la variation du temps d'existence des régimes renormalisé par le temps total d'observation en fonction du cisaillement pour les vésicules 7, 14 et 4 sur la figure 9.6.

On constate pour les vésicules 7 et 4 qu'une augmentation du cisaillement induit une baisse du temps passé par les vésicules dans le régime 1 et augmente le temps passé en adhésion à forte vitesse et sans adhésion. Ainsi, en augmentant les contraintes hydrodynamiques on augmente le temps passé par la vésicule dans des régimes de non-adhésion ou d'adhésion à forte vitesse. On remarque aussi que pour le plus faible taux de cisaillement, pour les trois vésicules, le temps passé dans le régime de non-adhésion est majoritaire. on peut expliquer

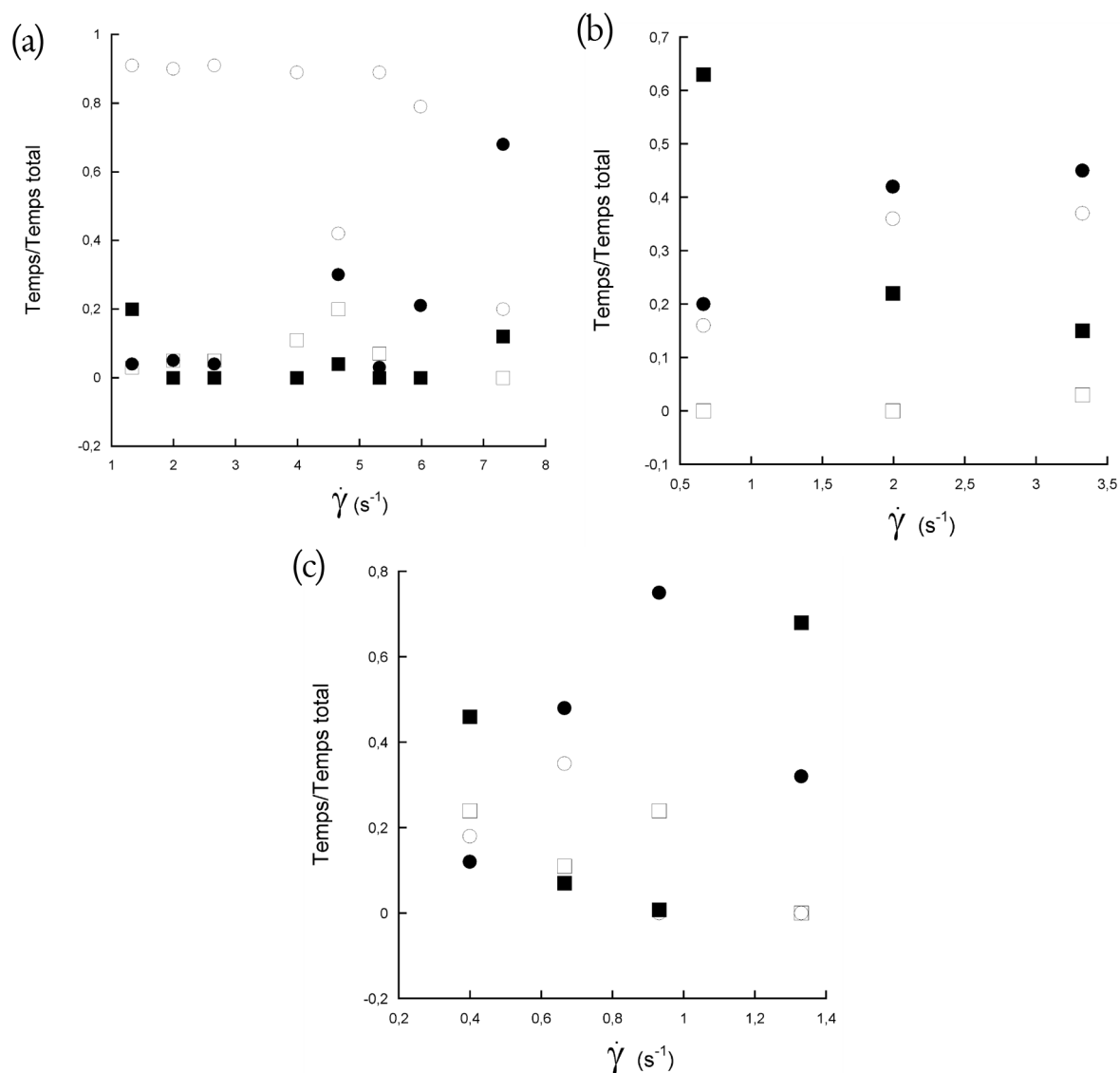


FIG. 9.6 – (a) : vésicule 7, (b) : vésicule 14, (c) : vésicule 4. \circ : régime 1, \square : régime 2, \bullet : régime 3, \blacksquare : régime 4.

cela par le fait que lors de la mise sous flux des vésicules au plus faible taux de cisaillement, le pousset-seringue fait légèrement décoller les vésicules. Elles ne peuvent donc pas adhérer sur la surface et il faut attendre leur sédimentation pour pouvoir observer une adhésion. Enfin, la vésicule 14 présente un comportement opposé aux deux autres vésicules : plus le cisaillement est fort et plus la vésicule s'accroche sur la surface. Une hypothèse est que si la surface est assez hétérogène, la vésicule lors de son déplacement peut arriver dans une zone possédant un nombre suffisamment important d'histidines pour stopper la vésicule. En effet, cette vésicule était toujours adhérente à la surface, même après avoir augmenté le cisaillement jusqu'à 11 s^{-1} .

9.1.6 Cas des vésicules déformées

Les déplacements typiques que l'on a illustré précédemment ont été obtenus pour des vésicules quasi-sphériques. Dès que l'on a souhaité observer des déplacements en adhésion pour des vésicules légèrement dégonflées ou obtenir des vésicules fortement adhérentes à la surface, ces vésicules sous l'action de la force de portance décollaient immédiatement lors de la mise en place du flux.

9.1.7 Capture forte d'une vésicule

Afin d'illustrer le rôle de la mobilité des molécules d'adhésion dans une bicouche lipidique, on a observé aussi l'arrêt d'une vésicule recouverte de biotine se déplaçant sur un substrat décoré avec de la streptavidine [Cuvelier et al., 2004]. Dans des fortes concentrations en biotine et en streptavidine, les vésicules présentent des formes de demi-sphère et ne bougent pas lors de leur mise sous écoulement. Par contre, dans des régimes dilués en streptavidine sur la surface, on peut observer un déplacement puis un attachement ferme. La figure 9.7 illustre ce cas. On a remarqué que l'accrochage de la vésicule se fait sur une distance qui

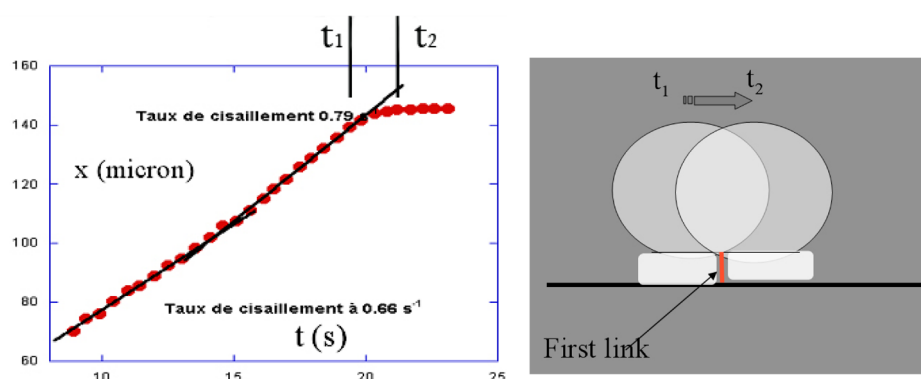


FIG. 9.7 – Déplacement d'une vésicule recouverte de streptavidine sur un tapis de biotine. Au début, la vésicule se déplace à vitesse constante puis, elle s'arrête de façon définitive.

est égale à la longueur de contact de l'objet. Ainsi, de part la fluidité de la membrane, un lien se forme à l'instant t_1 à l'avant de la vésicule, puis la vésicule continue d'avancer jusqu'à ce qu'à l'instant t_2 le lien se retrouve à l'arrière de la vésicule. L'interaction entre la biotine et la streptavidine étant suffisamment forte pour empêcher tout déplacement.

9.1.8 Conclusion

On a donc observé des vésicules qui n'étant pas en adhésion avec la surface suivent la loi de Goldman et se déplacent à quelques microns de la surface. On a aussi montré que la variation de la hauteur séparant la vésicule de la surface est linéaire au taux de cisaillement appliqué et donc aux forces hydrodynamiques. Cette variation suppose l'existence d'une force

de portance fixant la hauteur de déplacement de la vésicule. Malgré le fait que les vésicules se déplacent à une telle hauteur, elles sont capables de s'accrocher à la surface. En effet, on a obtenu des régimes de saltation où après un déplacement sans adhésion à une hauteur de l'ordre du micron, la vésicule s'accroche (sa vitesse de déplacement est nulle) puis repart. Ce type de déplacement peut être expliqué par la présence d'une forte rugosité ponctuelle de la surface et par des fluctuations de l'ordre du micron de la membrane. Enfin, on a réussi à voir des vésicules en adhésion et en mouvement où les déplacements se font à des vitesses non constante avec des accélérations et des freinages. On a alors proposé une méthode d'analyse afin de découper ces déplacements complexes en suite de régimes non-linéaires. Une des principale interrogation est : est-ce que ces changements de vitesse sont directement imputable à l'interaction d'adhésion utilisée ou bien est-elle principalement due à une hétérogénéité de la surface ? Ces mouvements d'adhésion n'ont été observé que sur une très faible proportion de vésicules. Afin d'effectuer une étude plus systématique, on a alors eu recours à l'utilisation de billes d'agarose servant à la purification de protéines his-tagguées. La suite va présenter les résultats obtenus sur des billes d'agarose en adhésion sur une surface recouverte d'histidine.

9.2 Adhésion contrôlée de billes d'agarose : détachement

Contrairement aux vésicules, les billes ne possèdent pas de membrane fluide. Les effets de mobilité de sites et de fluctuation de la membrane n'interviennent donc pas dans les processus d'adhésion. Les billes ont une plus faible déformabilité que les vésicules. Les surfaces sur lesquelles les expériences d'adhésion avec des billes d'agarose ont été effectuées, ont été préparées avec le protocole final (chapitre 4.3.2). Dans un premier temps, on va regarder le détachement des billes soumises à un cisaillement en présence d'imidazole afin de s'assurer de la présence d'histidines sur la surface et de vérifier la spécificité de l'interaction. Ensuite, on va s'intéresser aux mouvements en adhésion sous flux de ces billes, par deux techniques de microscopie : à l'aide du RICM, on va regarder localement les comportements alors que la microscopie classique permet de sonder les mouvements sur des grandes distances.

On a observé le détachement de billes recouvertes de nickel dans un écoulement de cisaillement en présence de concentrations croissantes d'imidazole. On s'attend à ce que plus la concentration d'imidazole en solution est importante et plus le pourcentage de billes restant adhérentes diminue. En effet, l'imidazole est la partie complexante de l'histidine. Il va donc entrer en compétition avec les molécules d'histidine présentes sur la surface et empêcher l'adhésion des billes.

9.2.1 Conditions expérimentales

Des billes sont injectées dans une chambre de flux puis laissées au repos en contact avec la surface pendant 10 minutes après leur sédimentation. Une fenêtre d'observation est choisie et découpée en sous-fenêtres ayant la taille de l'écran ($800 \times 600 \mu\text{m}^2$) (figure 9.9). La population de billes qui restent attachées sous écoulement est mesurée dans chacune de ces fenêtres.

Dans le tableau 9.4, on présente les différentes expériences réalisées sur six surfaces fonctionnalisées. Les surfaces 2.1 et 2.2 (et respectivement 3.1 et 3.2) ont été fonctionnalisées dans le même bain et les expériences ont été faites à 1 jour d'intervalle.

Surface n°	$\dot{\gamma}$ (s^{-1})	Temps de mise sous flux (s)	Billes/ mm^2
		τ	
1	25.3	360	55
2.1	15.9	570	32
2.2	15.9	570	34
3.1	15.9	570	6
3.2	15.9	570	8
4	4.77	1880	4.5
4	15.9	570	5
4	34.98	262	6

TAB. 9.4 – Paramètres expérimentaux pour les différentes surfaces étudiées : densité de billes, taux de cisaillement appliqués et surfaces étudiées.

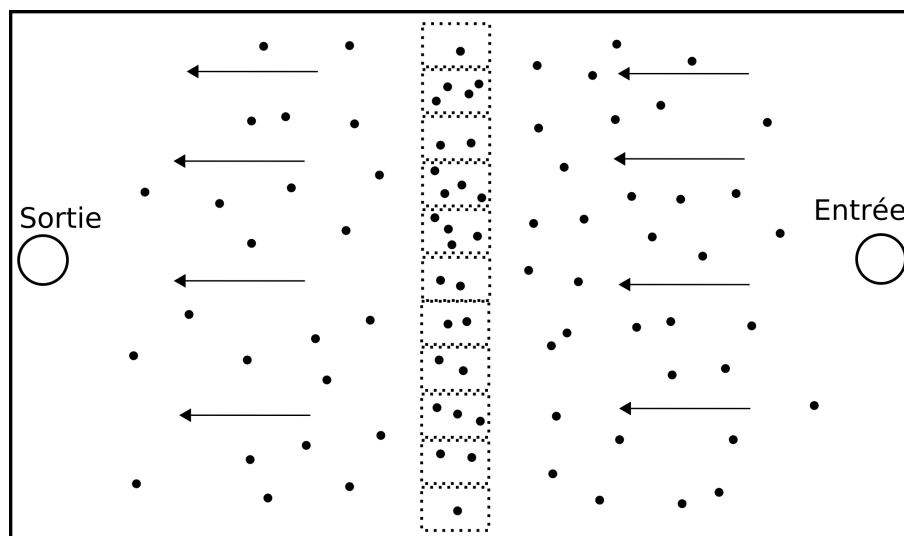


FIG. 9.8 – Représentation schématique de la chambre d'écoulement de dimension $15.9 \times 9.9 \text{ mm}^2$. Les flèches indiquent le sens du flux et les ronds noirs représentent les billes. Après injection de billes, nous ne prenons en compte que les billes se trouvant dans la suite de fenêtres en pointillés.

Chaque expérience consiste à fixer le taux de cisaillement et à appliquer successivement des écoulements de solutions contenant des concentrations croissantes en imidazole. Les solutions sont composées de 100 mM de NaCl et d'une concentration variable d'imidazole, le tout étant à un pH égal à 7.9. Chaque écoulement est appliqué pendant le temps τ , correspondant à un volume d'écoulement injecté de 17.5 mL.

9.2.2 Observations

La figure 9.9 illustre le détachement de billes lors de l'ajout d'imidazole. On peut observer que des billes présentes sur les figures 9.9(a) et (c) se sont détachées (9.9(b) et (d)) lors de l'addition d'imidazole dans la solution. On peut observer à l'extrémité droite de la figure 9.9(c), la présence d'une bille non pleine, présentant des cassures sur sa surface. Ce genre d'objet n'a pas été pris en compte dans le comptage de la population de billes.

9.2.3 Méthodes d'analyse

On repère par vidéo les billes et on ne sélectionne que celles qui sont éloignées d'une dizaine de microns des bords. On exclut celles qui arrivent dans les fenêtres d'observation (l'ajout d'imidazole génère une arrivée non-contrôlée de billes). On considère dans les statistiques de détachement qu'une bille qui est détachée pour une concentration en imidazole C_1 est aussi détachée pour une concentration en imidazole C_2 tant que C_2 est supérieure à C_1 . Pour chaque surface étudiée, on détermine le nombre de billes qui restent accrochées et le rayon, R , de chacune d'entre elles. Il est donc possible de caractériser le détachement des

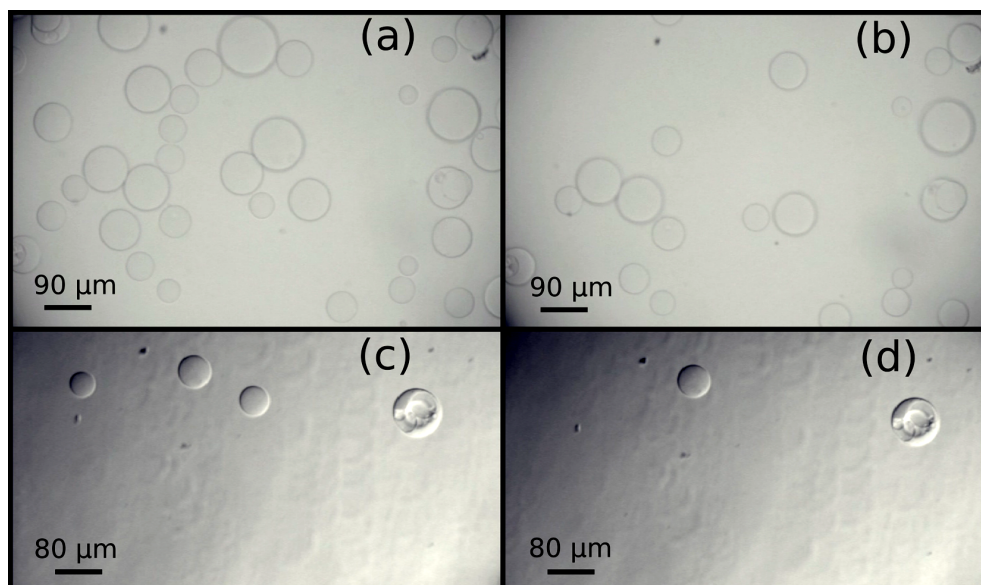


FIG. 9.9 – (a) et (b) : une des fenêtres d’observation de la surface 1. (c) et (d) : une des fenêtres d’observation de la surface 4. (b) : billes restantes de (a) après ajout d’imidazole. (d) : billes restantes de (c) après ajout d’imidazole. (a) et (b) sont des images obtenues par une visualisation des billes en microscopie en champ clair alors que les images (c) et (d) ont été obtenues à l’aide du DIC.

billes en fonction de leur rayon en les regroupant par tranches de 10 ou de 20 μm de diamètre¹

9.2.4 Résultats

Le nombre de billes restant attachées, après leur mise sous cisaillement, à une concentration donnée d’imidazole, pour un taux de cisaillement arbitraire de 15.9 s^{-1} , est déterminé pour chaque surface. Le résultat est présenté sur la figure 9.10 (a).

On constate l’existence d’une concentration-seuil en imidazole permettant le détachement des billes de la surface. Pour des surfaces préparées à des temps différents, le seuil de détachement varie de 60 mM à 500 mM. Par contre, pour deux surfaces préparées au même moment, la cinétique de détachement est identique.

L’effet du changement du taux de cisaillement sur l’adhésion des billes a ensuite été observé. Le résultat est présenté sur la figure 9.10 (b). On constate que les billes se détachent plus tardivement pour un cisaillement faible (de 4.77 s^{-1}). De plus, le pourcentage de billes détachées diminue lorsque le taux de cisaillement augmente aux fortes concentrations en imidazole.

On note que les billes qui se détachent en premier de la surface sont les billes présentant un grand diamètre (typiquement pour des valeurs supérieures à $70 \mu\text{m}$). Afin de rendre

¹pour des raisons statistiques, on regroupe les billes par tranches de 20 μm quand elles sont peu nombreuses alors que pour des quantités importantes, elles sont regroupées par tranches de 10 μm .

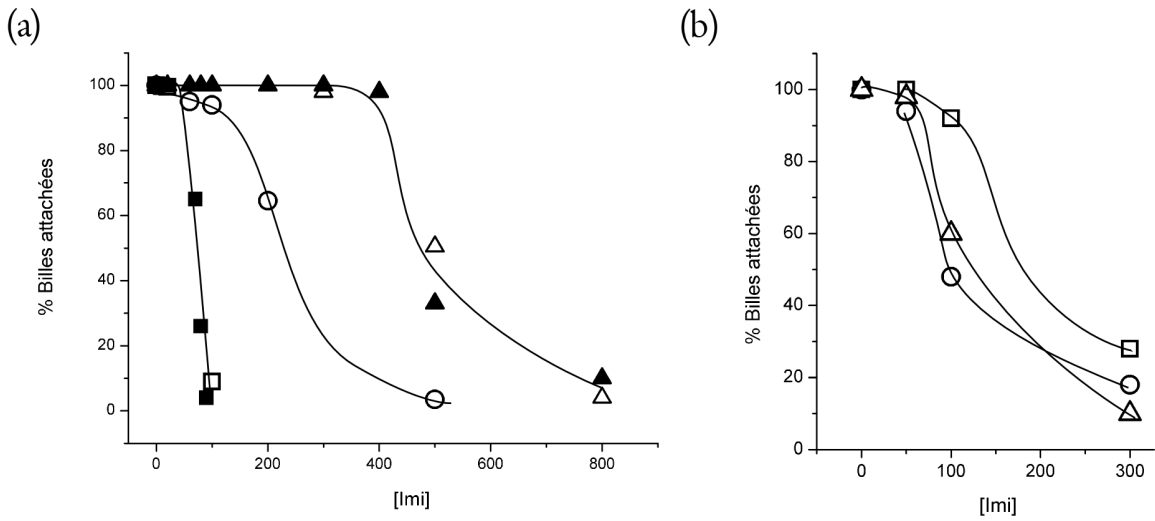


FIG. 9.10 – (a) : Variation du pourcentage de billes attachées en fonction de la concentration en imidazole pour différentes surfaces : \circ : surface 1, \square : surface 2.1, \blacksquare : surface 2.2, \triangle : surface 3.1 et \blacktriangle : surface 3.2. (b) : Variation du pourcentage de billes attachées en fonction de la concentration en imidazole pour la surface 4 et pour différents taux de cisaillement appliqués. \square : $\dot{\gamma} = 4.77 s^{-1}$, \circ : $\dot{\gamma} = 15.9 s^{-1}$ et \triangle : $\dot{\gamma} = 34.98 s^{-1}$. Les lignes sont des guides pour les yeux.

compte de ce phénomène, le pourcentage de billes restant accrochées à un taux d'imidazole donné a été tracé en fonction du rayon des billes. La figure 9.11 montre que quelle que soit la surface prise en considération, et quel que soit le taux de cisaillement appliqué, l'ajout progressif d'imidazole décroche tout d'abord les plus grandes billes.

9.2.5 Interprétation

On se propose d'établir la loi de détachement des billes en fonction de 3 paramètres pertinents que sont :

- la concentration en imidazole ($[Imi]$ en mM) qui régule le nombre de récepteurs disponibles
- le cisaillement $\dot{\gamma}$ qui détermine les contraintes hydrodynamiques
- le rayon R des billes qui influe sur la force exercée sur la bille mais aussi sur la taille de la zone de contact entre la bille et le substrat

Cozens-Roberts et ses collaborateurs [Cozens-Roberts et al., 1990c], [Cozens-Roberts et al., 1990b] ont calculé que le cisaillement appliqué pour détacher une bille est une constante dépendante de la densité de récepteurs disponibles, R_l et du rapport du rayon de la zone de contact des objets, a sur leur rayon, R , à la puissance 3, selon la relation suivante (vue au chapitre 2.4.4)

$$\dot{\gamma} \propto (a/R)^3 R_l \quad (9.1)$$

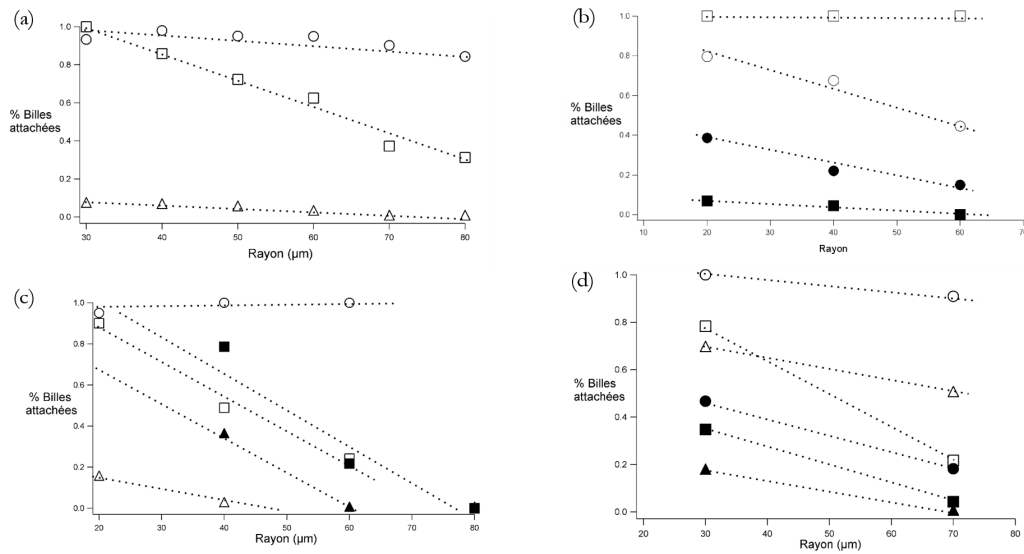


FIG. 9.11 – Variation du nombre de billes attachées en fonction du rayon pour les différentes surfaces. (a) : surface 1 avec la représentation suivante : \circ $[imi] = 100$ mM, \square : $[imi] = 200$ mM, \triangle : $[imi] = 500$ mM. (b) surface 2.2 avec la représentation suivante : \square : $[imi] = 20$ mM, \circ : $[imi] = 70$ mM, \bullet : $[imi] = 80$ mM et \blacksquare : $[imi] = 90$ mM. (c) surfaces 3.1 et 3.2 avec la représentation suivante : les symboles ouverts et pleins font respectivement référence aux surfaces 3.1 et 3.2. \circ : $[imi] = 300$ mM, \square : $[imi] = 500$ mM, \triangle : $[imi] = 800$ mM, \blacksquare : $[imi] = 500$ mM et \blacktriangle : $[imi] = 800$ mM. (d) surface 4 avec la représentation suivante : \circ $[imi] = 100$ mM et $\dot{\gamma} = 4.77$ s $^{-1}$, \bullet $[imi] = 300$ mM et $\dot{\gamma} = 4.77$ s $^{-1}$. \square : $[imi] = 100$ mM et $\dot{\gamma} = 15.9$ s $^{-1}$. \blacksquare : $[imi] = 300$ mM et $\dot{\gamma} = 15.9$ s $^{-1}$. \triangle : $[imi] = 100$ mM et $\dot{\gamma} = 34.98$ s $^{-1}$. \blacktriangle : $[imi] = 300$ mM et $\dot{\gamma} = 34.98$ s $^{-1}$. Les lignes pointillées sont des guides pour les yeux.

Relation entre $[Imi]$ et N_l

Le nombre de récepteurs disponibles permettant l'accrochage des billes va, quant à lui, dépendre de la concentration en imidazole. En effet, l'ajout d'imidazole en solution diminue le nombre de récepteurs disponibles. Pour déterminer la densité de récepteurs libres, on va utiliser l'équation de stabilité présentée au chapitre 3.1.1 :

$$\beta_2 = \frac{[NiImi_2]}{[Imi]^2[Ni]} \quad (9.2)$$

De plus, la quantité totale de nickel ($[Ni]^T$) lors du détachement est la somme du nombre de molécules de nickel chélatées par l'imidazole ($[NiImi_2]$) et du nombre de molécules de nickel libres $[Ni]$ (accessibles à une chélation) :

$$[Ni]^T = [Ni] + [NiImi_2] \quad (9.3)$$

En combinant les deux relations, on obtient :

$$[Ni]^T = [Ni] + \beta_2[Imi]^2[Ni] \quad (9.4)$$

On peut donc écrire que la densité de récepteurs libres, $R_l = \frac{[\text{Ni}]}{[\text{Ni}]^T}$, suis l'expression :

$$R_l \propto \frac{1}{1 + \beta_2 [\text{Imi}]^2}. \quad (9.5)$$

Relation entre R et a

Le modèle de Cozens-Roberts et coll, obtient par des arguments géométriques, pour un objet sphérique rigide, que le rayon de la zone de contact varie selon la relation :

$$a \propto \sqrt{R} \quad (9.6)$$

Le calcul est décrit au chapitre 2.4.4.

Si la bille est élastique, on peut appliquer le modèle de Johnson-Kendall-Roberts (JKR) [Johnson et al., 1971], [Israelachvili, 1992]. Ce modèle prévoit que la zone de contact d'une bille élastique en interaction avec une surface plane varie en fonction du rayon de la bille selon la relation :

$$a \propto R^{2/3} \quad (9.7)$$

Cette approche a été utilisée pour ajuster avec succès les résultats des expériences de Moy et coll [Moy et al., 1999] sur des billes d'agarose en adhésion spécifique sur une surface.

D'après (9.5), (9.6) et (9.7) mis dans (9.0), on peut définir deux paramètres de normalisation suivant que l'on considère la bille comme un objet rigide ou comme un objet élastique :

(i) dans le cas d'une bille rigide, c'est à dire $a \propto \sqrt{R}$:

$$\dot{\gamma} \propto (a/R)^3 R_l \quad (9.8)$$

$$\dot{\gamma} (R/a)^3 / R_l = \text{constante} \quad (9.9)$$

$$\dot{\gamma} R^{3/2} (1 + \beta_2 [\text{Imi}]^2) = \text{constante} \quad (9.10)$$

(ii) dans le cas d'une bille élastique légèrement déformable, c'est à dire $a \propto R^{2/3}$

$$\dot{\gamma} \propto (a/R)^3 R_l \quad (9.11)$$

$$\dot{\gamma} (R/a)^3 / R_l = \text{constante} \quad (9.12)$$

$$\dot{\gamma} R (1 + \beta_2 [\text{Imi}]^2) = \text{constante} \quad (9.13)$$

Ces relations permettent de représenter le détachement des billes en fonction de ces deux paramètres de normalisation qui ne diffèrent que par l'exposant de la puissance du rayon : figure 9.12 pour une bille élastique et figure 9.13 dans le cas d'une bille sphérique rigide.

On observe raisonnablement une courbe maîtresse mais la précision ne permet pas de trancher sur la puissance de R à utiliser : on ne peut pas savoir si on doit considérer la bille comme élastique ou non.

On remarque aussi que cette normalisation ne fonctionne pas dans le cas du détachement de billes sur la surface 2.2. Or pour cette surface, les billes se détachaient pour des concentrations en imidazole très faibles (figure 9.10) comparées aux concentrations utilisées pour purifier des protéines (300 mM d'imidazole) et aux concentrations en imidazole utilisées

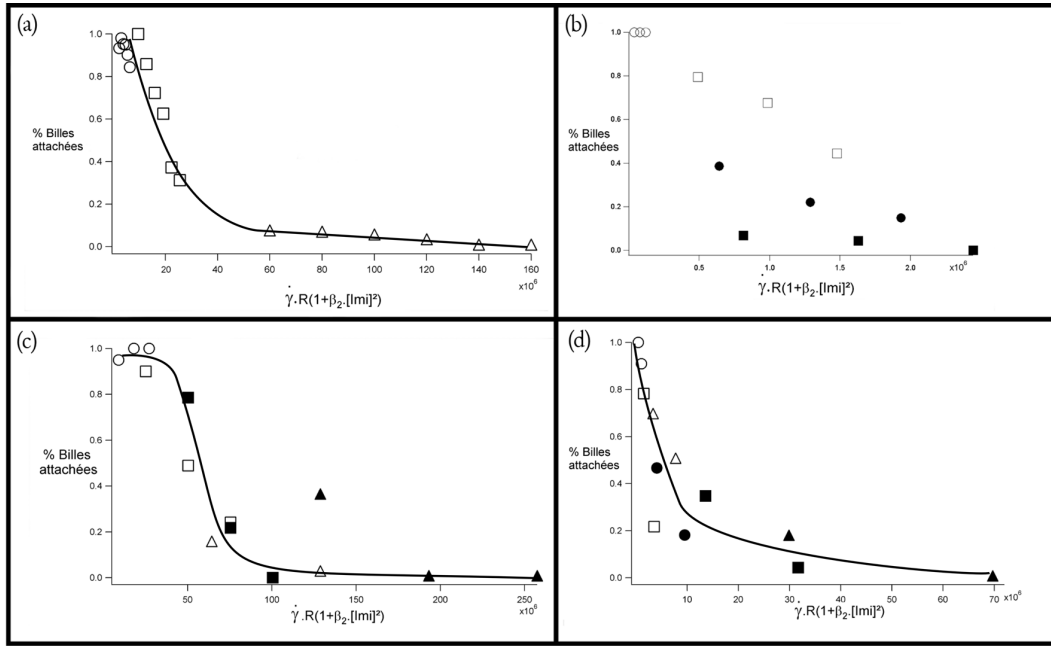


FIG. 9.12 – Variation du nombre de billes attachées en fonction du paramètre de normalisation dans le cas d'une bille élastique pour les différentes surfaces. (a) : surface 1 avec la représentation suivante : \circ $[imi] = 100$ mM, \square : $[imi] = 200$ mM, \triangle : $[imi] = 500$ mM. (b) surface 2.2 avec la représentation suivante : \square : $[imi] = 20$ mM, \circ : $[imi] = 70$ mM, \bullet : $[imi] = 80$ mM et \blacksquare : $[imi] = 90$ mM. (c) surfaces 3.1 et 3.2 avec la représentation suivante : les symboles ouverts et pleins font respectivement référence aux surfaces 3.1 et 3.2. \circ : $[imi] = 300$ mM, \square : $[imi] = 500$ mM, \triangle : $[imi] = 800$ mM, \blacksquare : $[imi] = 500$ mM et \blacktriangle : $[imi] = 800$ mM. (d) surface 4 avec la représentation suivante : \circ $[imi] = 100$ mM et $\dot{\gamma} = 4.77$ s $^{-1}$, \bullet $[imi] = 300$ mM et $\dot{\gamma} = 4.77$ s $^{-1}$. \square : $[imi] = 100$ mM et $\dot{\gamma} = 15.9$ s $^{-1}$. \blacksquare : $[imi] = 300$ mM et $\dot{\gamma} = 15.9$ s $^{-1}$. \triangle : $[imi] = 100$ mM et $\dot{\gamma} = 34.98$ s $^{-1}$. \blacktriangle : $[imi] = 300$ mM et $\dot{\gamma} = 34.98$ s $^{-1}$. Les lignes sont des guides pour les yeux.

pour les autres surfaces (figure 9.10). Une hypothèse pour expliquer cela est que la densité de ligands sur la surface 2.2 est trop faible et très hétérogène. Ainsi, si sur la surface on n'a qu'une molécule d'histidine, l'ajout d'imidazole ne change pas la cinétique de détachement et le phénomène que l'on observe n'est peut-être imputable qu'au cisaillement.

9.2.6 Conclusion

Le modèle sur lequel on s'est basé pour normaliser les courbes de détachement est un modèle de "tout ou rien", où dès que le flux appliqué est plus faible que le flux critique de détachement alors toutes les billes restent accrochées. Par contre, si le flux est plus important que le flux critique alors toutes les billes se détachent. Or on constate que pour nos expériences et dans les autres expériences de détachements de cellules ou de billes [Cozens-Roberts et al., 1990c], [Thoumine et al., 1996], [Décavé et al., 2002] le détachement est progressif. Une hypothèse

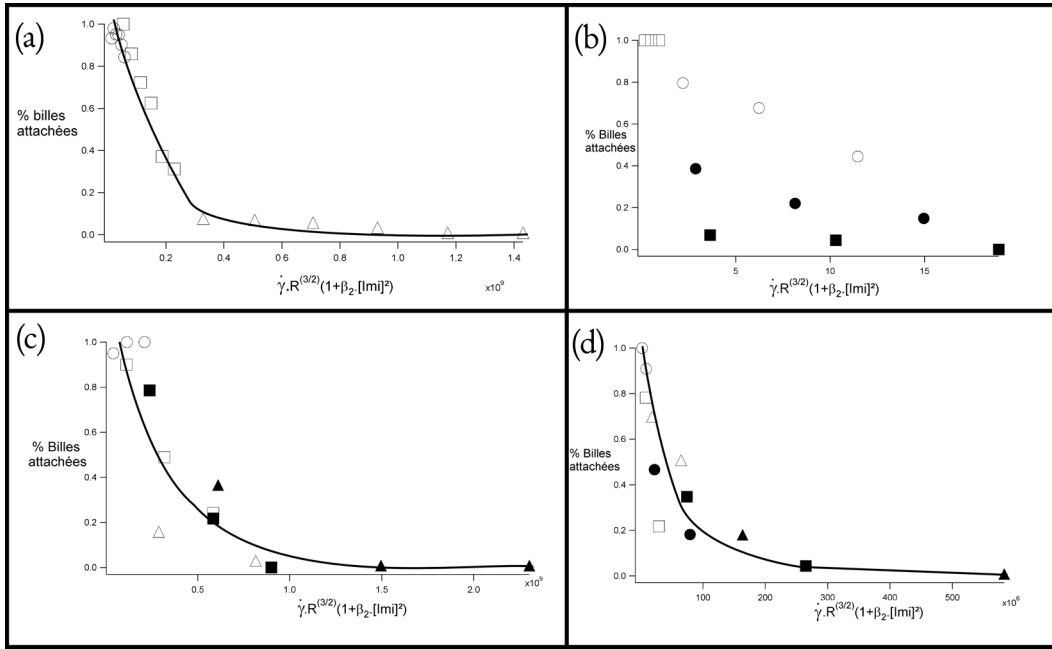


FIG. 9.13 – Variation du nombre de billes attachées en fonction du paramètre de normalisation dans le cas d'une bille sphérique rigide pour les différentes surfaces. (a) : surface 1 avec la représentation suivante : o [imi] = 100 mM, □ : [imi] = 200 mM, △ : [imi] = 500 mM. (b) surface 2.2 avec la représentation suivante : □ : [imi] = 20 mM, o : [imi] = 70 mM, ● : [imi] = 80 mM et ■ : [imi] = 90 mM. (c) surfaces 3.1 et 3.2 avec la représentation suivante : les symboles ouverts et pleins font respectivement référence aux surfaces 3.1 et 3.2. o : [imi] = 300 mM, □ : [imi] = 500 mM, △ : [imi] = 800 mM, ■ : [imi] = 500 mM et ▲ : [imi] = 800 mM. (d) surface 4 avec la représentation suivante : o [imi] = 100 mM et $\dot{\gamma} = 4.77 \text{ s}^{-1}$, ● [imi] = 300 mM et $\dot{\gamma} = 4.77 \text{ s}^{-1}$. □ : [imi] = 100 mM et $\dot{\gamma} = 15.9 \text{ s}^{-1}$. ■ : [imi] = 300 mM et $\dot{\gamma} = 15.9 \text{ s}^{-1}$. △ : [imi] = 100 mM et $\dot{\gamma} = 34.98 \text{ s}^{-1}$. ▲ : [imi] = 300 mM et $\dot{\gamma} = 34.98 \text{ s}^{-1}$. Les lignes sont des guides pour les yeux.

pour expliquer ce détachement progressif est que les billes ne présentent pas des densités de récepteurs ni une zone de contact identiques les unes par rapport aux autres à cause d'une rugosité présente sur les billes.

Au vu des résultats et des courbes maîtresses observées, on a obtenu une non-reproductibilité des surfaces les unes par rapport aux autres. Par contre, sur une surface donnée, on a une courbe maîtresse (sur 3 des 4 surfaces étudiées) où l'adhésion est spécifique, contrôlée, modulable par la concentration en imidazole. On arrive donc raisonnablement à obtenir une courbe maîtresse de détachement en représentant le pourcentage de billes attachées en fonction du taux de cisaillement, de la concentration en imidazole au carré et en fonction de R à une puissance α , α valant $3/2$ ou 1 , selon que l'on considère la bille comme rigide ou élastique. Les prochaines expériences seront faites sur une même surface du début à la fin de l'expérience.

9.3 Adhésion contrôlée de billes : dynamique sous écoulement vue par RICM

Dans une première étape, on a regardé par RICM le mouvement de billes en adhésion. Ce sont les premières expériences dynamiques vue par RICM depuis Lorz [Lorz et al., 2000]. Une observation en RICM de la dynamique des billes d'agarose en adhésion permet de mesurer h , la hauteur entre le bas de la bille et la surface, V , la vitesse de déplacement de la bille et $V_{\text{glissement}}$, sa vitesse de glissement.

9.3.1 Méthodes d'observations et conditions expérimentales

Le mouvement des billes a été obtenu par l'utilisation d'un objectif x 63, allouant une très bonne résolution : 1 pixel vaut 100 nm. En général, la fenêtre d'observation des billes a une taille de $135 \times 50 \mu\text{m}^2$.

On a déposé sur des surfaces fonctionnalisées (par le protocole final) avec des histidines des billes d'agarose recouvertes de nickel dans un milieu composé d'une solution de NaCl à 100 mM et d'imidazole à 450 mM le tout à un pH égal à 7.9. Ces billes sont ensuite soumises à un cisaillement hydrodynamique par l'intermédiaire d'un pousse-seringue.

9.3.2 Observations et analyses

La figure 9.14 montre une bille d'agarose en adhésion sur une surface recouverte d'histidines. On observe des franges d'interférence concentriques. Contrairement à des vésicules

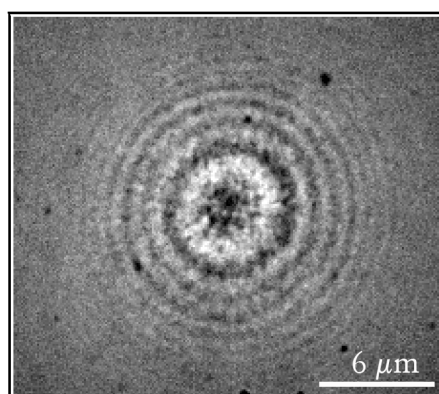


FIG. 9.14 – Vue en RICM d'une bille d'agarose en adhésion

6.4, les franges d'interférence ne sont pas lisses mais texturées. Cet effet est dû à la porosité des billes d'agarose. A partir de la détermination des franges d'interférence, on peut calculer h , la hauteur séparant la bille de la surface.

Mesure de la distance séparant une bille d'une surface.

Afin de déterminer h , les billes sont supposées être parfaitement sphériques et on suppose que le faisceau lumineux éclairant la bille est parallèle et arrive et repart perpendiculairement au substrat, comme nous le voyons sur la figure 9.15.

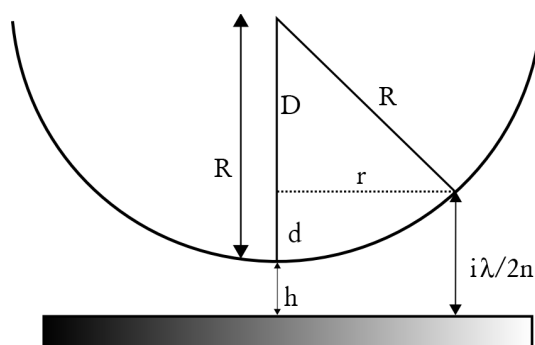


FIG. 9.15 – Représentation schématique du calcul de h , la distance séparant la bille de la surface. λ est la longueur d'onde de la lumière, n , l'indice de réfraction du milieu, i le numéro de la frange, r la distance séparant le centre de la bille de la frange d'interférence et R le rayon de la bille.

L'observation d'une frange d'interférence indique qu'à l'endroit de la frange d'interférence (r , figure 9.15), la distance séparant la bille de la surface vaut $i\lambda/2n$, i étant le numéro de la frange, n l'indice de réfraction du milieu et λ , la longueur d'onde de la lumière. Selon la figure 9.15, on peut écrire que $h = i\lambda/2n - d$, où d suit la relation suivante : $d = R - D = R - (\sqrt{R^2 - r^2})$.

On peut remarquer sur la figure 9.14 que les premières franges d'interférence ne sont pas parfaitement sphériques. Cette légère déformation du motif d'interférence entraîne une incertitude sur la mesure de la hauteur qui est de l'ordre d'une dizaine de nm. A partir de l'observation de la tache d'adhésion, on peut calculer une vitesse de glissement ainsi qu'une rugosité.

Mesure de la vitesse de glissement et de la rugosité des billes

En pointant la position de taches d'adhésion au cours du temps, on peut calculer une vitesse de glissement pour la bille. La figure 9.16 montre le suivi d'une tache d'adhésion.

Outre la mesure d'une vitesse de glissement, la tache centrale d'adhésion permet de mesurer une rugosité des billes. En effet, la tache d'adhésion n'est pas uniforme mais présente différents niveaux d'intensité. On a donc calculé la rugosité des billes à partir des variations de l'intensité des taches d'adhésion dans la zone de contact. En mesurant l'intensité de la frange d'interférence la plus noire, l'intensité de la frange d'interférence la plus blanche, l'intensité des taches et en utilisant l'équation 6.2, on obtient une variation de la hauteur dans la zone d'adhésion d'environ 30 nm.

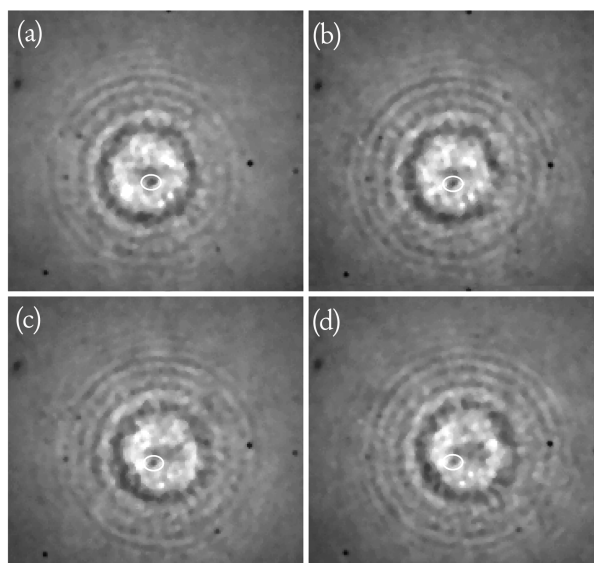


FIG. 9.16 – Suivi d’une tache d’adhésion au cours du temps. La tache est repérée par le cercle blanc. L’intervalle de temps entre chaque image est de $1/18$ s.

Suivi automatique du déplacement des billes : mesure de la vitesse de déplacement

Outre la mesure de h , les franges d’interférence permettent le suivi automatique du déplacement de la bille (chapitre 7.3.2). À partir de l’enregistrement des positions des 6 premières franges d’interférence au cours du temps, on mesure les positions successives du centre de la bille et on calcule la vitesse de déplacement de l’objet.

On a enregistré le déplacement de 5 billes soumises à des cisaillements différents, à une fréquence de 18 images par seconde. Le tableau 9.5 présente le rayon de chaque bille et les taux de cisaillement appliqués. Les vitesses de déplacement sont dans la suite moyennées sur

N°	$\dot{\gamma}$ s^{-1}	R μm
1	1.6	27
2	1.6	20
3	0.8	11
3	1.6	11
3	3.9	11
4	1.6	23
5	1.6	20
5	3.9	20

TAB. 9.5 – Paramètres expérimentaux pour les billes en adhésion observées en RICM. R est le rayon et $\dot{\gamma}$ est le taux de cisaillement.

5 ou 10 intervalles de temps soit respectivement 0.27 et 0.55 s, suivant la valeur du cisaillement appliqué. La hauteur est moyennée sur 1/9 s.

9.3.3 Résultats

Bille sans adhésion

La bille n° 3 présente un déplacement sans adhésion. La figure 9.17 montre l'évolution au cours du temps de la vitesse de déplacement et de la hauteur de la bille pour le taux de cisaillement le plus élevé. On constate que la vitesse augmente sur les 6 premières secondes

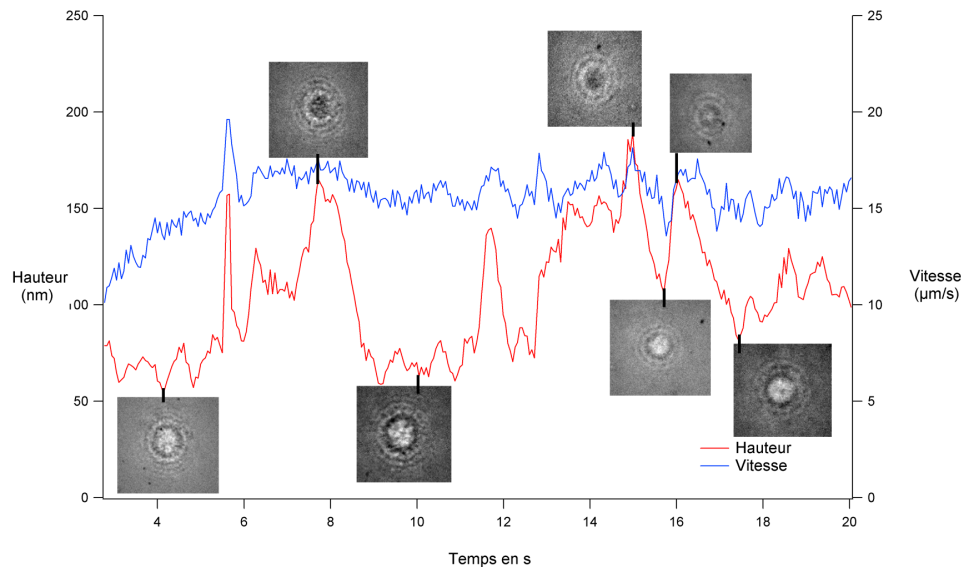


FIG. 9.17 – Evolution temporelle de la vitesse et de la distance séparant une bille de la surface, illustrée par des images de la bille vue en RCM. $\dot{\gamma}$ vaut 3.9s^{-1} .

avant de se stabiliser autour d'une vitesse de $16\text{ }\mu\text{m/s}$. Cette augmentation progressive de la vitesse illustre l'établissement du régime stationnaire du flux. On observe aussi que la vitesse et la hauteur sont assez bien corrélées : à un pic de hauteur correspond un pic de vitesse. Enfin, lors d'une observation en RCM, une tache centrale noire indique que l'objet est en adhésion (figure 6.4). Or ici, pour les faibles hauteurs, la tache centrale est blanche et devient noire pour les grandes hauteurs. Le passage d'une tache blanche à une tache noire indique que la bille s'est éloignée de la surface.

Analyse des vitesses On a calculé l'histogramme des vitesses pour les trois taux de cisaillement appliqués après établissement d'un régime stationnaire. La figure 9.18 présente cet histogramme. On constate qu'une augmentation du taux de cisaillement s'accompagne directement d'une augmentation de la vitesse de déplacement. Le tableau 9.6 présente la valeur de la vitesse moyenne en fonction du taux de cisaillement appliqué.

La vitesse de déplacement de la bille 3 varie linéairement avec l'augmentation du taux de cisaillement, comportement conforme à la loi de Goldman à b constant (figure 9.19).

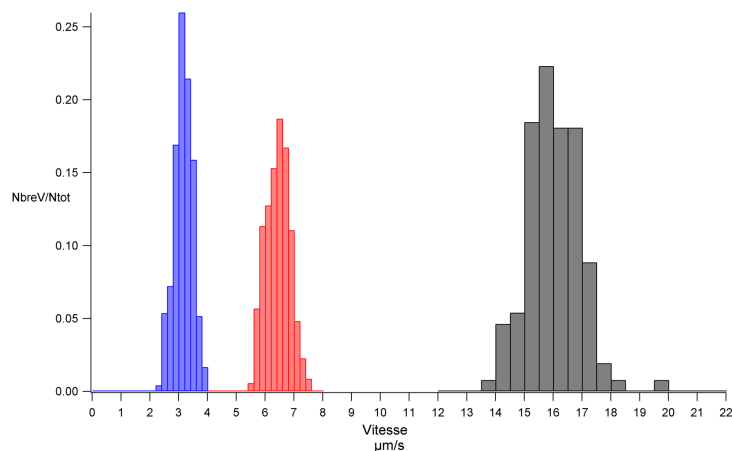


FIG. 9.18 – Histogramme de la vitesse de translation de la bille 3. L'histogramme des vitesses en bleu correspond à un taux de cisaillement de 0.8 s^{-1} , le rouge correspond à un taux de cisaillement de 1.6 s^{-1} et le noir à un taux de cisaillement de 3.9 s^{-1}

Vitesse ($\mu\text{m/s}$)	$\dot{\gamma}$ (s^{-1})
3.15 ± 0.31	0.795
6.42 ± 0.40	1.59
16.02 ± 0.90	3.975

TAB. 9.6 – Vitesses moyennes du déplacement d'une bille sans adhésion en fonction du taux de cisaillement appliqué.

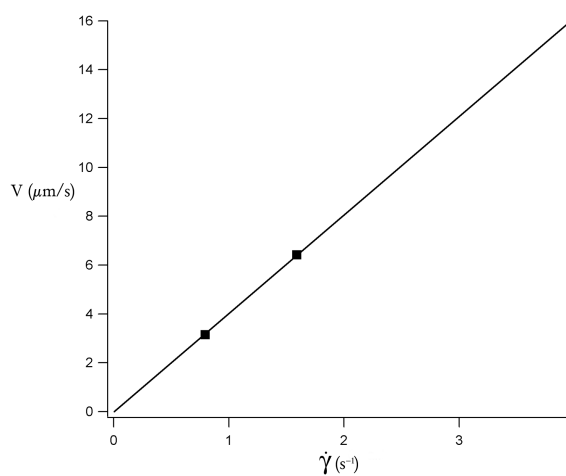


FIG. 9.19 – Variation de la vitesse moyenne de déplacement en fonction du taux de cisaillement appliqué pour la bille 1.

Analyse des hauteurs On a ensuite regardé l'évolution de l'histogramme des hauteurs moyennes mesurées lors du mouvement en fonction du taux de cisaillement. La figure 9.20 montre l'histogramme des hauteurs pour chacun des taux de cisaillement appliqués. On

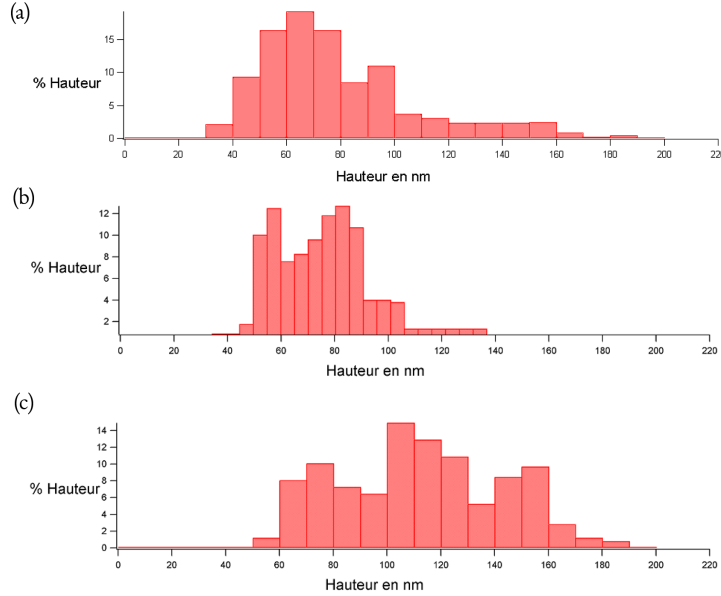


FIG. 9.20 – Histogramme des hauteurs mesurées lors du déplacement d'une bille sans adhésion pour différents taux de cisaillement. (a) : le taux de cisaillement est de 0.8 s^{-1} , (b) : le taux de cisaillement est de 1.6 s^{-1} et (c) : le taux de cisaillement est de 3.9 s^{-1}

remarque, pour le taux de cisaillement le plus faible, un pic de hauteur vers les 70 nm. Pour un taux de cisaillement de 1.6 s^{-1} , on observe un premier pic à 55 nm et un second pic à 90 nm. Enfin, pour le taux de cisaillement le plus important, l'histogramme des hauteurs présente un pic vers les 110 nm. Ainsi, une augmentation du cisaillement s'accompagne d'un décalage vers des hauteurs plus grandes de l'histogramme des hauteurs comme illustré sur la figure 9.21. Les hauteurs sont supérieures à 40 nm.

Discussion On va montrer que la bille n'est pas en adhésion : (i) pour les hauteurs les plus faibles, on n'a pas observé de tache centrale noire caractéristique d'une adhésion 6.4, [Rädler et al., 1995]. (ii) les hauteurs mesurées sont toutes supérieures à 40 nm. (iii) les vitesses sont proportionnelles au cisaillement. On les a alors comparées à la valeur théorique de la vitesse de déplacement d'une bille donnée par Goldman [Goldman et al., 1967] :

$$\frac{V}{\dot{\gamma}h} = \frac{0.7431}{0.6376 - 0.2\ln(\delta/R)} \quad (9.14)$$

avec R le rayon de la bille, δ la distance séparant la bille de la surface et $h = R + \delta$. On a tracé sur un même graphique, pour le plus fort taux de cisaillement appliqué, la variation de la vitesse de déplacement mesurée en fonction de la hauteur mesurée et la courbe théorique

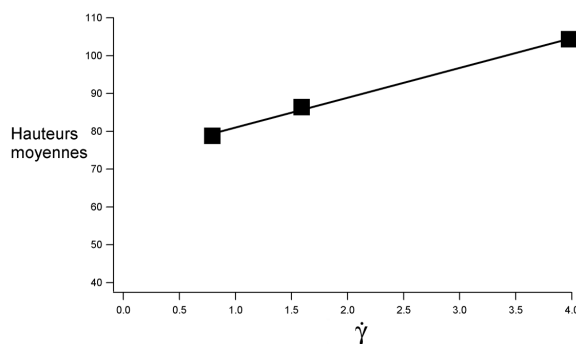


FIG. 9.21 – Variation de la hauteur moyenne en fonction du taux de cisaillement. La droite est un ajustement linéaire.

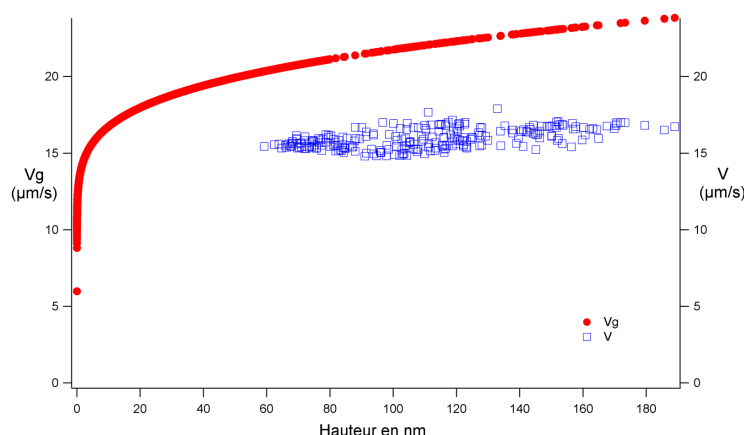


FIG. 9.22 – Comparaison de la variation de la vitesse mesurée en fonction de la hauteur mesurée à la courbe théorique donnée par Goldman (V_g).

de la vitesse de translation en fonction de la hauteur : figure 9.26. Ce graphique présente un résultat intéressant : la vitesse de déplacement de la bille 1 sans interaction est d'environ 20 à 25 % inférieure à la vitesse théorique prédite par Goldman. Enfin, les billes présentent une rugosité d'environ 30 nm, cette rugosité ajoutant peut-être une friction locale freinant le déplacement de la bille et donc justifiant l'écart entre la courbe théorique et la mesure. Ces arguments nous indiquent que cette bille n'est pas en adhésion.

On remarque que la vitesse est toujours supérieure à 50 % de la vitesse de Goldman calculée pour une hauteur de 50 nm. Or selon Hammer [Greenberg et al., 2000], [Chang et al., 2000], cela indique que la bille n'est pas en adhésion.

Les hauteurs se situent entre 40 et 180 nm, ces hauteurs étant beaucoup plus faibles que celles déterminées pour des vésicules non-adhérentes : la hauteur à laquelle se trouvent les vésicules est de l'ordre du micron. On peut alors se demander quel est l'équilibre des forces qui fixe h . La force qui contrebalance le poids est une force de portance. D'après la formule proposée par Abkarian et Viallat [Abkarian and Viallat, 2005] : $F \propto \eta \dot{\gamma} R^3 / h f(1 - \nu)$, F étant la

force de portance. L'ajustement linéaire de la variation de h en fonction de γ (figure 9.21), permet de calculer le rapport $P.h/\eta\dot{\gamma}R^3$, P est le poids de la bille. L'ajustement linéaire donne un rapport pour $h/\dot{\gamma}$ de 7.9 soit une force de portance renormalisée de $1.5 \cdot 10^{-2}$. En comparant cette valeur à celles trouvées par Abkarian et Viallat 9.23, on obtient un taux de dégonflement de la bille de 1, valeur cohérente pour une bille.

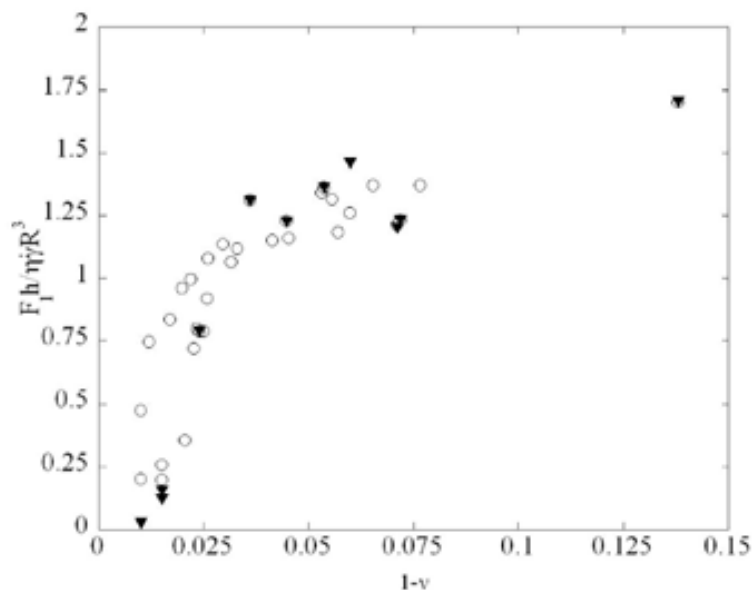


FIG. 9.23 – Variation de la force de portance renormalisée en fonction de $(1-\nu)$, ν étant le taux de dégonflement.

Déplacement de billes en roulement sans glissement.

Ce type de comportement correspond à des régimes de déplacement de billes où la vitesse de glissement mesurée est nulle : la bille se déplace en roulement sans glissement. Ce type de déplacement a été observé sur les billes 1, 2, 4 et 5. Les billes 2 et 5 ayant le même rayon, on a les regroupées ensemble. Dans ce régime, nous n'avons pas pris en compte les vitesses nulles, quand la bille ne bouge pas. Afin de sonder un effet du rayon sur les vitesses de déplacement des billes en roulement sans glissement et sur les hauteurs à laquelle les billes se déplacent, on a tracé l'histogramme des vitesses et des hauteurs mesurées pour un même cisaillement : 1.6 s^{-1} pour les billes 2, 5, 4 et 1. Ces histogrammes sont présentés sur la figure 9.25.

On constate que les histogrammes des vitesses et des hauteurs ne changent pas de façon significative lors de l'augmentation du rayon de la bille. On peut constater un léger décalage dans l'histogramme des hauteurs pour la bille 1, mais ce décalage d'une dizaine de nm reste dans l'incertitude de la mesure. On a ensuite regardé la dépendance des vitesses et des hauteurs au taux de cisaillement appliqué. La figure 9.25 présente les histogrammes des vitesses et des hauteurs de la bille 5 pour deux taux de cisaillement. On ne constate pas une réelle tendance sur l'histogramme des vitesses et des hauteurs. Sur l'histogramme des hauteurs, on

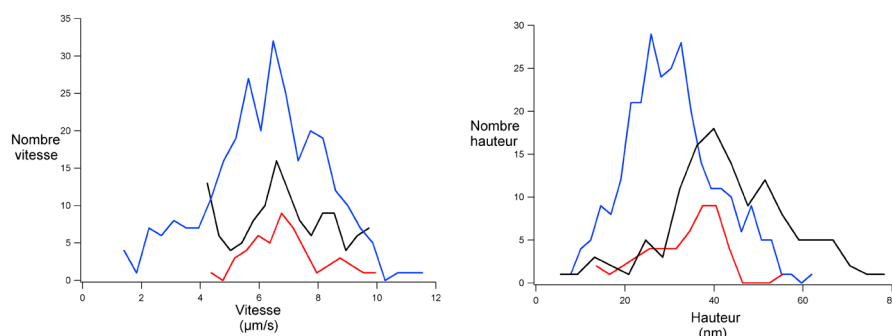


FIG. 9.24 – Histogrammes des vitesses et des hauteurs pour les billes 2, 5, 4 et 1. La courbe bleue correspond à la bille 1, la noire aux billes 2 et 5 et la rouge à la bille 4.

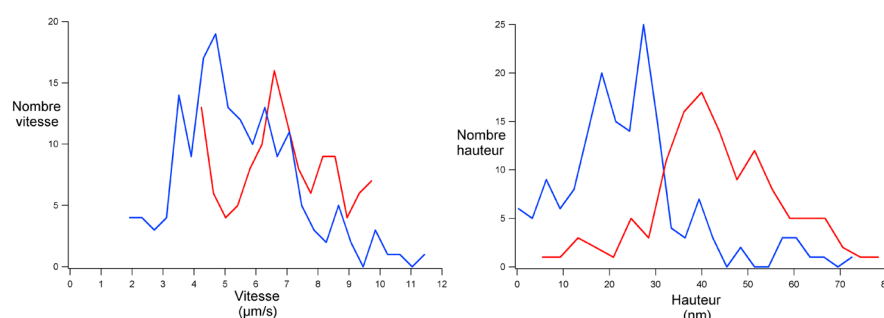


FIG. 9.25 – Histogrammes des vitesses et des hauteurs pour la bille 5. La courbe bleue correspond à un $\dot{\gamma}$ de 3.9 s^{-1} et la rouge à un $\dot{\gamma}$ de 1.6 s^{-1}

peut observer une léger décalage de 10 nm, qui reste dans l'incertitude de la mesure de la hauteur.

Discussion Comme précédemment, on a comparé la vitesse des billes 2,5 aux vitesses théoriques calculées par l'équation de Goldman : figure 9.26 A nouveau, les vitesses mesurées sont plus faibles que celles prédites par Goldman, cet écart étant principalement dû à l'adhésion des billes sur la surface. On n'a pas vu de variation significative des hauteurs et des vitesses en fonction du rayon ou du cisaillement appliqué dans la plage sondée. Mais cette plage reste très faible, comme on le verra dans les expériences en transmission. Enfin, les vitesses de déplacement sont de l'ordre de $7 \mu\text{m/s}$ et les hauteurs sont pour la majorité inférieures à 60 nm. Les vitesses sont assez dispersées autour de $7 \mu\text{m/s}$. Une telle dispersion peut être due à la rugosité des billes. De plus, à cause de leur rugosité, les billes peuvent se trouver à une distance de la surface de 60 nm et être toujours en adhésion.

Déplacement avec une vitesse de glissement non nulle

Ce type de déplacement va être illustré sur la bille 2. On a tout d'abord représenté la vitesse de déplacement de cette bille au cours du temps ainsi que sa vitesse de glissement :

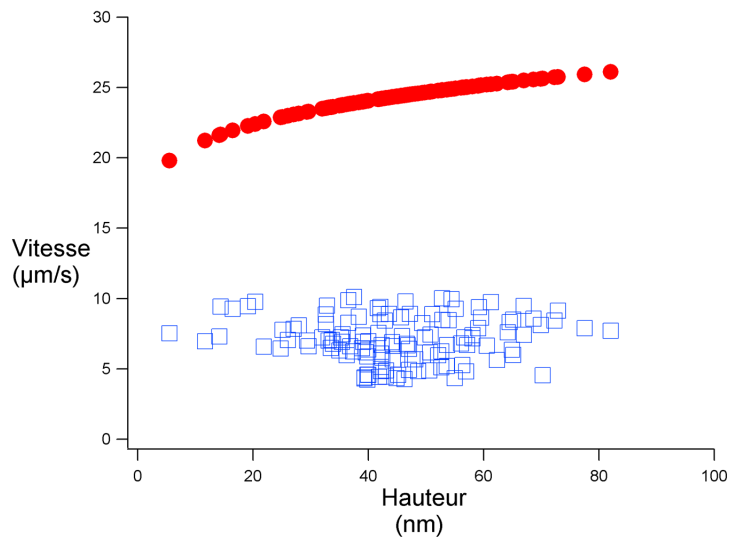


FIG. 9.26 – Comparaison entre les vitesses mesurées (en bleu) et la vitesse théorique prédite par Goldman (en rouge) pour les billes 2, 5.

figure 9.27. On constate que les vitesses de glissement sont comprises entre 0.89 et 4.07

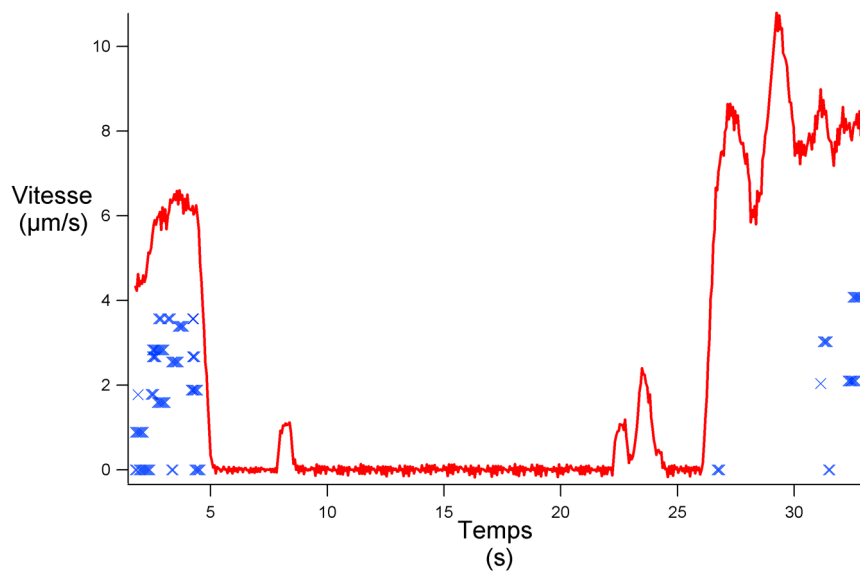


FIG. 9.27 – Variation temporelle de la vitesse de déplacement de la bille 2 (en rouge) et de sa vitesse de glissement (en bleu).

$\mu\text{m/s}$. En se référant à l'équation de Goldman donnant la variation du rapport de la vitesse de rotation sur la vitesse de translation en fonction de la hauteur (équation 2.30), on a dans

l'approximation où h vaut 0 :

$$\frac{\omega R}{V} > 0.5686 \quad \text{avec} \quad \omega R = V - V_{\text{glissement}} \quad (9.15)$$

$$1 - V_{\text{glissement}}/V < 0.5686 \quad \text{soit} \quad V_{\text{glissement}}/V > 0.4314 \quad (9.16)$$

La dépendance en h du rapport de la vitesse de rotation sur la vitesse de translation est en h/R . Ici, R étant toujours beaucoup plus grand que h , on suppose que l'équation précédente est correcte. On a alors reporté la variation de la vitesse de déplacement de la bille en fonction de sa vitesse de glissement sur la figure 9.28. On observe deux populations de vitesse :

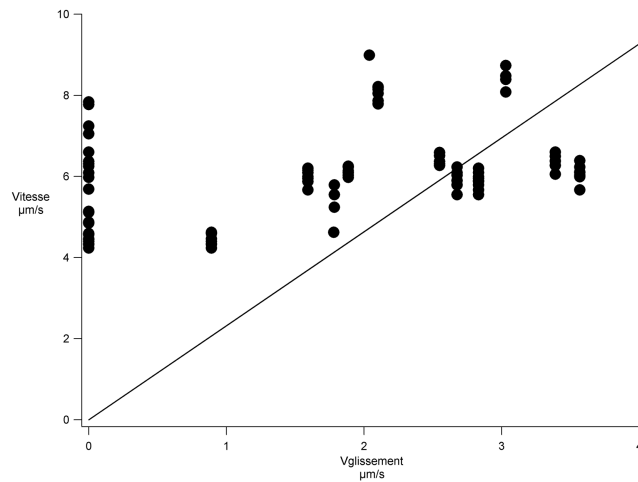


FIG. 9.28 – Variation de la vitesse moyenne de déplacement mesurée en fonction de la vitesse de glissement mesurée. On a reporté le critère de Goldman : $V_{\text{glissement}}/V > 0.4314$ qui équivaut à $V_{\text{glissement}} > 0.4314V$ qui équivaut à $V < 2.31V_{\text{glissement}}$. La droite noire a pour équation $V = 2.31V_{\text{glissement}}$.

une première population se trouvant au dessus de la droite prédite par Goldman pour $h = 0$. Ces vitesses présentent un glissement trop faible et sont donc considérées comme des vitesses appartenant à un régime d'adhésion. Par contre, les vitesses se trouvant sous la droite caractérisent un mouvement de glissement trop important où aucune adhésion n'est possible. On peut utiliser ces vitesses où le glissement est important pour définir un critère sur l'adhésion. En prenant la vitesse de glissement la plus faible et se trouvant sous la droite de Goldman, on détermine une vitesse de déplacement. Cette vitesse de déplacement (pour une hauteur de 50 nm) est alors comparée à la vitesse de Goldman calculée à 50 nm. On obtient alors que le rapport de la vitesse de déplacement mesurée sur la vitesse de Goldman à 50 nm est de 50 %. Par conséquent, on considère que si une vitesse mesurée est inférieure à 50% de la vitesse de Goldman calculée pour une hauteur de 50 nm : $V < 50\%V_g(50\text{nm})$, l'objet se trouve dans un régime d'adhésion. Par contre si $V > 50\%V_g(50\text{nm})$ alors l'objet n'est pas en adhésion.

Enfin, on a souhaité savoir à quelles hauteurs, ces vitesses de glissement ont été mesurées.

On a représenté la variation des vitesses de déplacement de la bille en fonction de la hauteur mesurée pour les vitesses de glissement précédentes : figure 9.29.

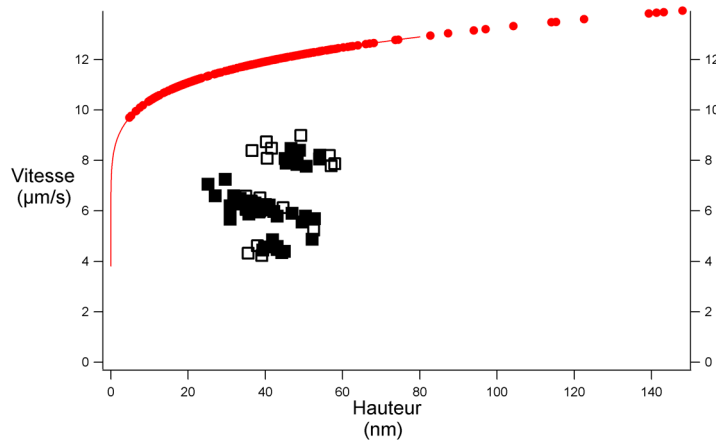


FIG. 9.29 – Variation des vitesses de déplacement pour lesquelles on a mesuré une vitesse de glissement en fonction de la hauteur. En rouge est représentée la vitesse théorique de Goldman, les carrés pleins correspondent à des vitesses de déplacement $< 2.31 V_{\text{glissement}}$ (il y a de l'adhésion spécifique) et les carrés ouverts correspondent à $V > 2.31 V_{\text{glissement}}$ (pas d'adhésion possible).

Ces régimes de glissement peuvent être interprétés par un régime d'adhésion transitoire très rapide ou bien par la rugosité des billes qui induisent temporairement un contact avec la surface.

Même en utilisant le RICM et malgré la mesure simultanée de la vitesse V et de la hauteur h , il est difficile de déterminer s'il y a ou non de l'adhésion. En effet, les billes étant rugueuses, une adhésion peut se produire pour de grandes hauteurs (supérieures à 40 nm et inférieures à 80 nm). C'est le traitement des données et leur cohérence qui permettent de conclure. Ce régime particulier de déplacement nous a permis de définir un critère d'adhésion à partir de la valeur de la vitesse de déplacement de la bille.

Mouvement global d'une bille

Il est intéressant de voir que les différents régimes précédemment cités peuvent être observés sur une même bille : figure 9.30.

Ainsi, pour la bille 2, on a un régime d'adhésion ferme (vitesse nulle), un régime de roulement sans glissement avec une vitesse de déplacement de $7 \mu\text{m/s}$, un régime de roulement avec glissement et enfin un régime sans adhésion avec rupture de tous les liens adhésifs. Pour des hauteurs et des vitesses de déplacement importantes, on observe un comportement intéressant indiqué par la flèche : la bille se déplace lentement ($8 \mu\text{m/s}$) sous l'action du flux et sa hauteur augmente de 80 à 140 nm. Ensuite, il y a une brusque augmentation de la vitesse puis une diminution de la vitesse et de la hauteur. Ce genre de comportement a

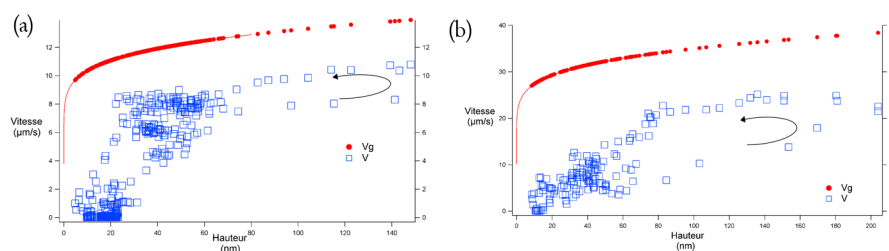


FIG. 9.30 – Variation des vitesses en fonction de la hauteur mesurée. En rouge, est tracée la courbe théorique de Goldman. (a) : vitesses de la bille 2. (b) : vitesses de la bille 4.

aussi été observé sur la bille 4 (figure 9.30 (b)). Une interprétation possible serait que la bille monte sur un défaut. Mais les images ne montrent pas de défaut. L'interprétation proposée est la suivante : au départ, les liens se cassent. La bille déformée par la liaison est asymétrique et subit une force de portance qui l'éloigne du substrat. La vitesse augmente (tout en restant inférieure à celle de Goldman) puis la forme de la bille relaxe et le poids fait sédimenter la bille. Après sédimentation, la bille est de nouveau capable de faire des liens avec la surface.

9.3.4 Conclusion

La technique de microscopie en RISM permet de mesurer et de coupler la vitesse de déplacement de l'objet avec la hauteur séparant l'objet de la surface. Ces expériences nous ont permis d'identifier très clairement différents régimes.

Un premier régime d'adhésion forte avec du roulement sans glissement où les hauteurs sont majoritairement inférieures à 50 nm et les distributions de vitesses sont similaires autour de 6-7 $\mu\text{m/s}$ dans la gamme de cisaillement, de rayon, de concentration en imidazole explorée. On a observé un deuxième régime d'adhésion ou de contact transitoire caractérisé par du roulement avec glissement. Les hauteurs sont comprises entre 20 et 60 nm, et les vitesses de glissement peuvent atteindre 4 $\mu\text{m/s}$ pour un cisaillement de 1.6 s^{-1} . Une interprétation possible de ce mouvement est que pendant l'intervalle de temps sondé (entre 0.3 et 0.6 s) il y a soit contact entre la bille et la surface soit formation et rupture de tous les liens.

Enfin, un troisième régime a été observé : un régime de non-adhésion, où les vitesses de déplacements sont proches mais inférieures aux vitesses de Goldman (70 % de la vitesse de Goldman). Dans ce régime, on a mis en évidence que les hauteurs sont supérieures à 40 nm, et qu'une augmentation du cisaillement engendre un déplacement plus rapide de la bille et un décollement. Comme la hauteur est proportionnelle au cisaillement appliqué, une force de portance, comme pour les vésicules, fixe la hauteur.

On a aussi vu qu'un même objet pouvait présenter ces 3 régimes pendant un déplacement de 135 $\mu\text{m/s}$, laissant penser qu'un faible nombre de liens est formé.

9.4 Adhésion contrôlée de billes : dynamique en adhésion des billes observées en transmission

9.4.1 Conditions expérimentales

Comme précédemment, des billes ont été injectées sur une surface recouverte d'histidines puis laissées au repos pendant 10 minutes après la sédimentation. On choisit une unique fenêtre d'observation qui restera la même durant toutes les expériences contrairement aux expériences de détachement de billes présentées au chapitre 9.2. Par rapport aux expériences menées en RICM, ici, les distances et les temps de parcours des objets sont plus grands. On va sonder des phénomènes d'adhésion sur des échelles plus grandes. Ensuite, le flux est appliqué et toutes les trajectoires $x(t)$ des billes se déplaçant dans la fenêtre sont enregistrées. Ces expériences sont différentes des expériences de décollement car ici on se focalise sur le déplacement des billes dans une seule fenêtre alors que précédemment, on s'intéressait au détachement des billes dans plusieurs fenêtres. Ainsi, lors du déplacement des billes en adhésion, on n'enregistrera principalement que le comportement des billes se trouvant initialement dans la fenêtre, les autres billes en amont avançant trop lentement pour pouvoir faire partie de la statistique. Par contre, dès que les billes vont se déplacer sans adhésion avec une vitesse plus grande, le nombre de billes sans adhésion dont on enregistrera le comportement sera plus grand. On risque donc de surestimer la proportion de billes sans adhésion par rapport à la proportion de billes en adhésion.

Le taux de cisaillement a été changé lors des expériences, afin d'observer un effet du taux de cisaillement sur les comportements. Les taux de cisaillement appliqués étaient de 4.73 s^{-1} , 15.9 s^{-1} et 34.98 s^{-1} . Enfin, pour obtenir des états d'adhésion différents, la concentration en imidazole de la solution, préparée avec du NaCl à 100 mM, servant à appliquer le flux a été varié. On a utilisé des concentrations croissantes d'imidazole : 100 mM, 200 mM et 450 mM.

9.4.2 Observations

La figure 9.31 présente des déplacements typiques de billes. Les figures 9.31 (a), (b) et (c) montrent des déplacements de billes en adhésion. La figure 9.31 (a) montre un déplacement à vitesse constante, coupé d'un déplacement à très faible vitesse ($4 \mu\text{m/s}$). Les figures 9.31 (b) et (c) montrent que les déplacements en adhésion sont constitués d'une succession de plusieurs régimes. On remarque qu'en première approximation, les vitesses globales de déplacement sont d'environ $4 \mu\text{m/s}$. Enfin, la figure 9.31 (d) montre un déplacement à vitesse constante d'une bille non adhérente. Sa vitesse de déplacement est de $228 \mu\text{m/s}$. Ainsi, les vitesses de déplacement des objets se situent entre $0.01 \mu\text{m/s}$ à plusieurs centaines de $\mu\text{m/s}$ quand la bille n'est pas en adhésion. Les temps des régimes se situent entre 0.08 et plusieurs dizaines de secondes.

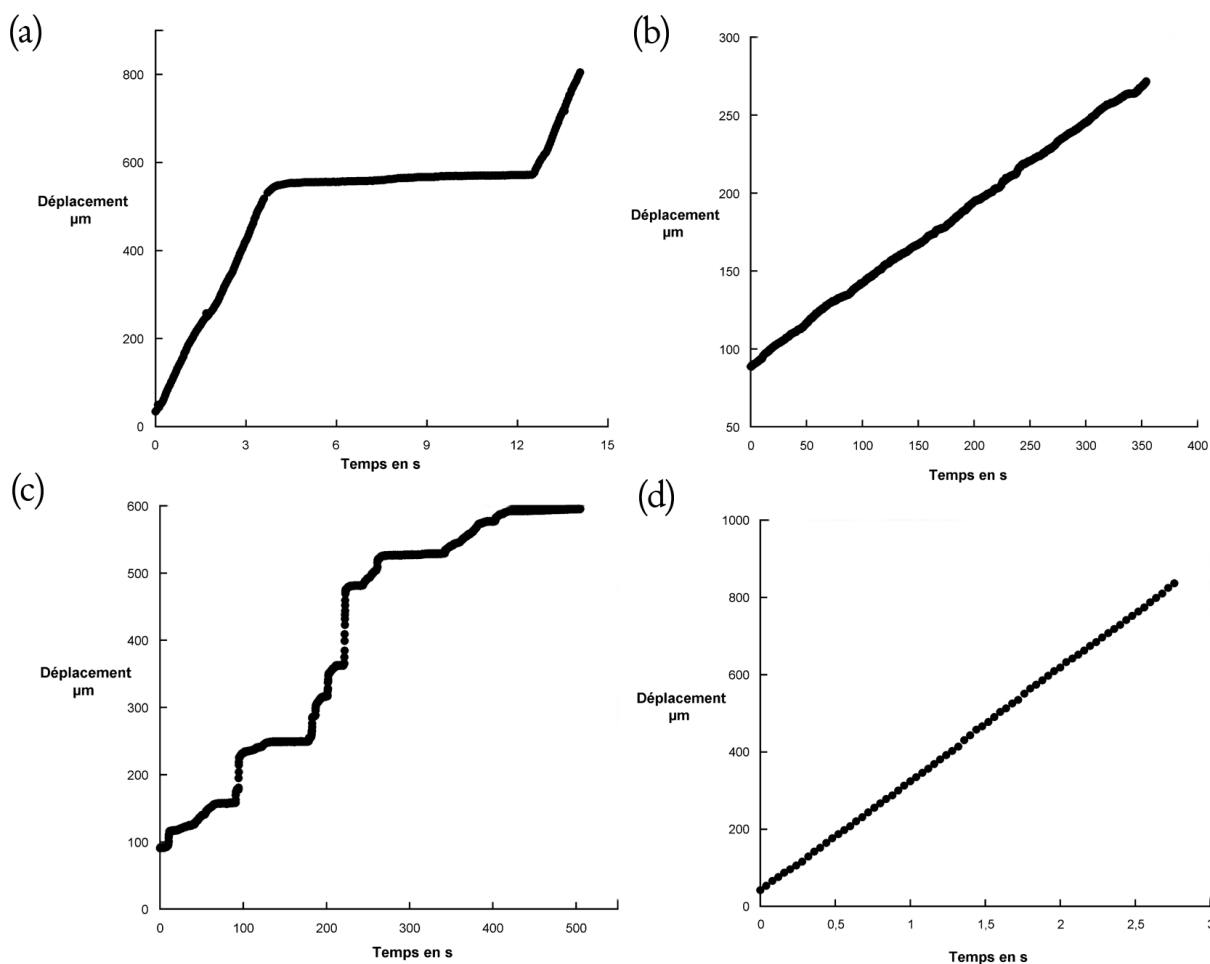


FIG. 9.31 – Exemples typiques de déplacements de billes. (a) : déplacement d’une bille soumise à un cisaillement de 15.9 s^{-1} . Son rayon est de $27.6 \mu\text{m}$ et la concentration en imidazole vaut 200 mM . (b) : déplacement d’une bille soumise à un cisaillement de 15.9 s^{-1} . Son rayon est de $47.8 \mu\text{m}$ et la concentration en imidazole vaut 100 mM . (c) : déplacement d’une bille soumise à un cisaillement de 15.9 s^{-1} . Son rayon est de $23.4 \mu\text{m}$ et la concentration en imidazole vaut 200 mM . (d) : déplacement d’une bille soumise à un cisaillement de 34.98 s^{-1} . Son rayon est de $27.3 \mu\text{m}$ et la concentration en imidazole vaut 450 mM .

9.4.3 Méthode d’analyse

Afin de déterminer et d’étudier les différents régimes de déplacement, on a choisi de découper les déplacements en suite de régimes linéaires. Ce découpage en suite de régimes est expliqué dans le chapitre 9.5 La figure 9.32 montre le déplacement d’une bille en adhésion et les régimes obtenus. Le déplacement de la bille de la figure 9.32 est découpé en 123 régimes à vitesse constante. Le tableau 9.7 montre la suite des régimes que l’on observe dans l’encart de la figure 9.32.

Les trajectoires ainsi analysées sont donc caractérisées par un nombre de régimes, un

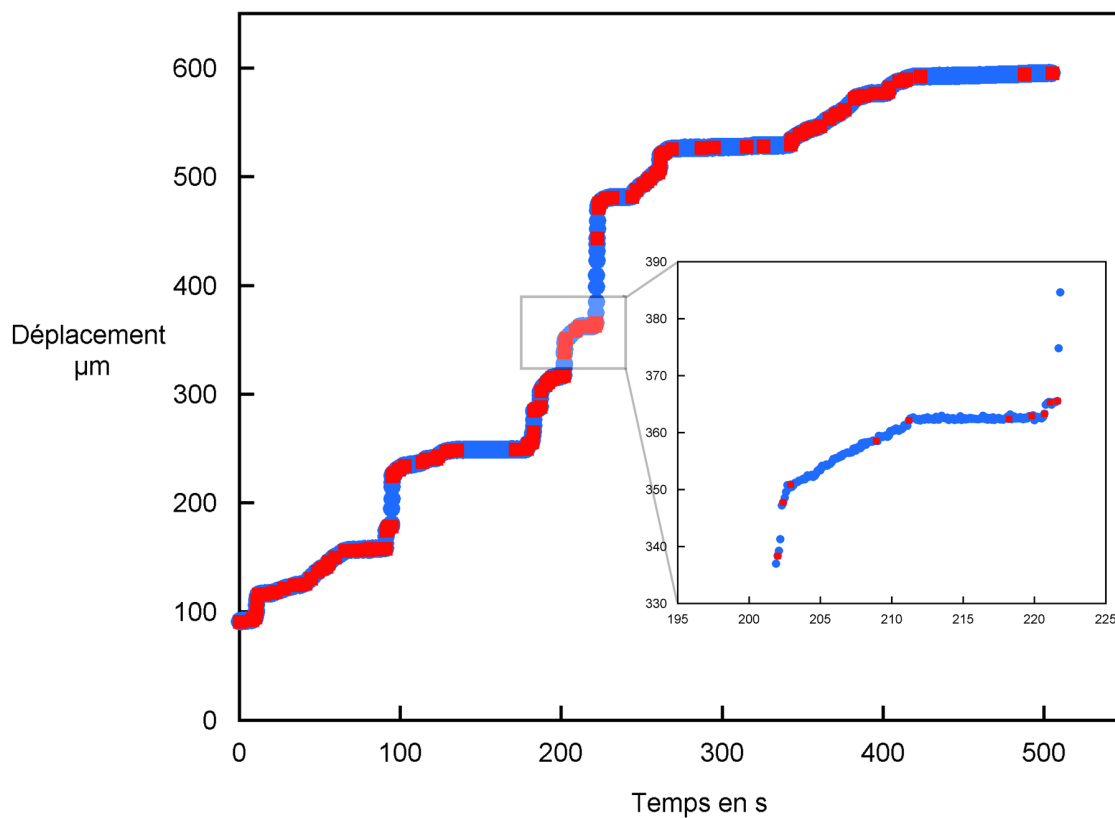


FIG. 9.32 – Exemple du déplacement au cours du temps d’une bille de $24\ \mu\text{m}$ de rayon soumise à un cisaillement de $15.9\ \text{s}^{-1}$ et de la détermination des différents régimes. Pour des raisons de lisibilité, le commencement et la fin des régimes sont marqués par un carré rouge. Par exemple, l’encart montre neuf régimes.

Vitesse ($\mu\text{m/s}$)	Temps (s)
26.740	0.39999
6.2315	0.50000
1.4181	6.0000
1.2416	2.3000
0.0071896	7.0000
0.085782	1.6000
0.19031	0.89999
4.5399	0.40001
0.68855	0.50000

TAB. 9.7 – Vitesse et temps des régimes observés dans l’encart de la figure 9.32.

régime étant lui-même caractérisé par une vitesse et un temps d’existence. Après la détermination de tous les régimes, on regarde si deux régimes successifs présentent des vitesses identiques au centième près. Si c’est le cas, alors ces deux régimes sont fusionnés pour n’en faire plus qu’un seul : on fait la moyenne des vitesses et on somme les temps. Enfin, tous les résultats sont groupés en fonction du rayon de la bille par paquet de 10 à 15 μm en fonction du flux appliqué et de la concentration d’imidazole.

9.4.4 Distribution des vitesses

A l’heure actuelle, on s’est principalement intéressé aux histogrammes des vitesses des billes. Au vu de la complexité et de la très forte richesse des mouvements observés, nous avons dans un premier temps choisi de répartir les régimes déterminés dans trois populations selon la vitesse du régime : une première population, $V_{\text{arrêt}}$, où les vitesses de déplacement indiquent une bille à l’arrêt ($< 0.1 \mu\text{m/s}$), une seconde population, V_- , où les vitesses sont caractéristiques d’une bille se déplaçant en adhésion et une dernière population, V_+ , où les vitesses correspondent à un déplacement sans adhésion.

Afin de répartir les régimes dans les différentes population, on va utiliser le critère d’adhésion que l’on a déterminé lors des expériences en RICM. En effet, le suivi de billes en adhésion et par RICM nous a permis de définir un critère sur la vitesse de déplacement d’une bille : si sa vitesse est inférieure à 50 % de la vitesse de Goldman à 50 nm, alors la bille est en adhésion. Sinon, elle se déplace sans être en interaction avec la surface. On va appliquer ce critère pour toutes les distributions de vitesses. On calcule la vitesse de Goldman théorique à 50 nm. Ensuite, si une vitesse est inférieure à 50 % de la vitesse de Goldman à 50 nm, le régime correspondant à cette vitesse est placé dans la population V_- . Sinon, il est placé dans la population des vitesses sans adhésion : V_+ . Les régimes où les vitesses sont inférieures à $0.1 \mu\text{m/s}$ sont rangés dans la population $V_{\text{arrêt}}$. La figure 9.33 présente 4 histogrammes typiques de vitesses obtenues pour des taux de cisaillement et des concentrations en imidazole différents. On observe par exemple pour une forte concentration en imidazole (450 mM) et un cisaillement faible, (figure 9.33 (a)) une distribution des vitesses autour de 0, 10 et 24

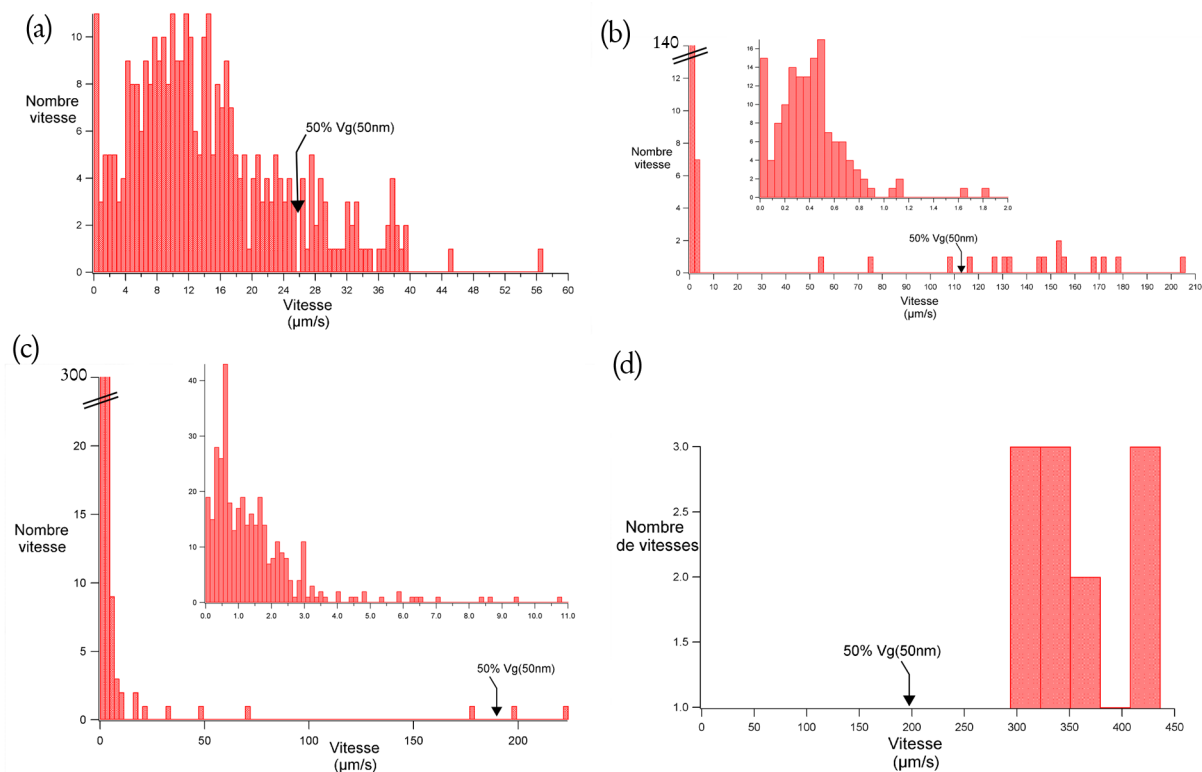


FIG. 9.33 – Histogrammes typiques des vitesses obtenues pour différents taux de cisaillement et différentes concentrations en imidazole. (a) : $\dot{\gamma} = 3.9 \text{ s}^{-1}$, $[\text{Imi}] = 450 \text{ mM}$ et $R = 34 \text{ } \mu\text{m/s}$. (b) : $\dot{\gamma} = 15.9 \text{ s}^{-1}$, $[\text{Imi}] = 100 \text{ mM}$ et $R = 40 \text{ } \mu\text{m/s}$. (c) : $\dot{\gamma} = 34.9 \text{ s}^{-1}$, $[\text{Imi}] = 100 \text{ mM}$ et $R = 30 \text{ } \mu\text{m/s}$. (d) : $\dot{\gamma} = 34.9 \text{ s}^{-1}$, $[\text{Imi}] = 450 \text{ mM}$ et $R = 31.6 \text{ } \mu\text{m/s}$. Chaque encart est un zoom aux petites vitesses de la distribution. Sur chaque distribution, a été reportée la valeur du critère d'adhésion.

$\mu\text{m/s}$. Pour les distributions des figures 9.33 (a) et (b), les vitesses se situent principalement entre 0 et 5 $\mu\text{m/s}$. Enfin, en présence d'une forte concentration en imidazole (450 mM) à un grand taux de cisaillement ((figure 9.33 (d)) on n'observe que des vitesses importantes se situant au-dessus du critère d'adhésion. On constate aussi, de temps en temps, que le critère d'adhésion ne définit pas de zone très claire sur la distribution des vitesses ((figure 9.33 (a)). On ne sait pas vraiment dans quelle population, les régimes dont les vitesses se situent proche de la valeur de ce critère doivent être placés. Or on considère que ces régimes, dont les vitesses sont proches du critère d'adhésion, sont peu nombreux par rapport aux autres régimes et que le placement arbitraire d'un de ces régimes dans la population V_- ou dans la population V_+ , ne change pas beaucoup le pourcentage des populations V_+ et V_- . On dispose de 3 observables que sont le rayon, la concentration en imidazole et le cisaillement appliqué, de trois distributions V_+ , $V_{\text{arrêt}}$ et V_- et du rapport entre les trois distributions.

9.4.5 Régimes de non-adhésion

Ces régimes de non-adhésion sont rangés dans la population V_+ . Ils sont caractérisés par des vitesses supérieures au critère d'adhésion. On a regardé la variation du pourcentage du nombre de régimes dont les vitesses appartiennent à V_+ (nombre de régimes de la population V_+ divisé par le nombre de régimes total) en fonction du rayon et de la concentration en imidazole tableau 9.8. On constate, surtout pour le cisaillement de 15.9 s^{-1} , que la pro-

$[\text{Imi}]$ (mM)	$\dot{\gamma}$ s^{-1}	R μm	% V_+
450	3.9	34	13.9
100	15.9	40	7.23
100	15.9	50	8.16
100	15.9	60	10.4
200	15.9	33	21.8
200	15.9	59	26
450	15.9	19	100
450	15.9	36	100
450	15.9	54	96
450	15.9	71	95
100	34.9	30	0.27
100	34.9	42	1.92
100	34.9	55	0
200	34.9	28	12
200	34.9	39	100
450	34.9	23	100
450	34.9	32	100
450	34.9	43	100

TAB. 9.8 – Tableau regroupant le pourcentage de régimes appartenant à V_+

portion de régimes de la population V_+ augmente légèrement avec le rayon des billes. Ce résultat peut être comparé à celui obtenu sur le détachement des billes où c'étaient les billes les plus grosses qui partaient en premier. Une telle tendance peut s'expliquer par le fait que la force hydrodynamique ressentie par une bille est plus importante pour les grandes billes que pour les petites. Si la force exercée sur la bille est plus importante pour les grosses billes, les grosses billes pourront être moins souvent en adhésion que les petites. Pour ce même cisaillement, on a moyenné le pourcentage des régimes appartenant à V_+ en fonction du rayon et tracé cette moyenne en fonction de la concentration en imidazole : figure 9.34(a).

Comme on s'y attend, on observe qu'une augmentation progressive de la quantité en imidazole induit une augmentation du pourcentage de régimes appartenant à V_+ . On a ajusté la courbe à l'aide de la fonction $\alpha[\text{Imi}]^2$ avec un bon accord. On a choisie cette fonction d'ajustement car lors des expériences de détachement, on a réussi à obtenir une courbe maîtresse du détachement des billes à l'aide d'une fonction dépendant de $[\text{Imi}]^2$.

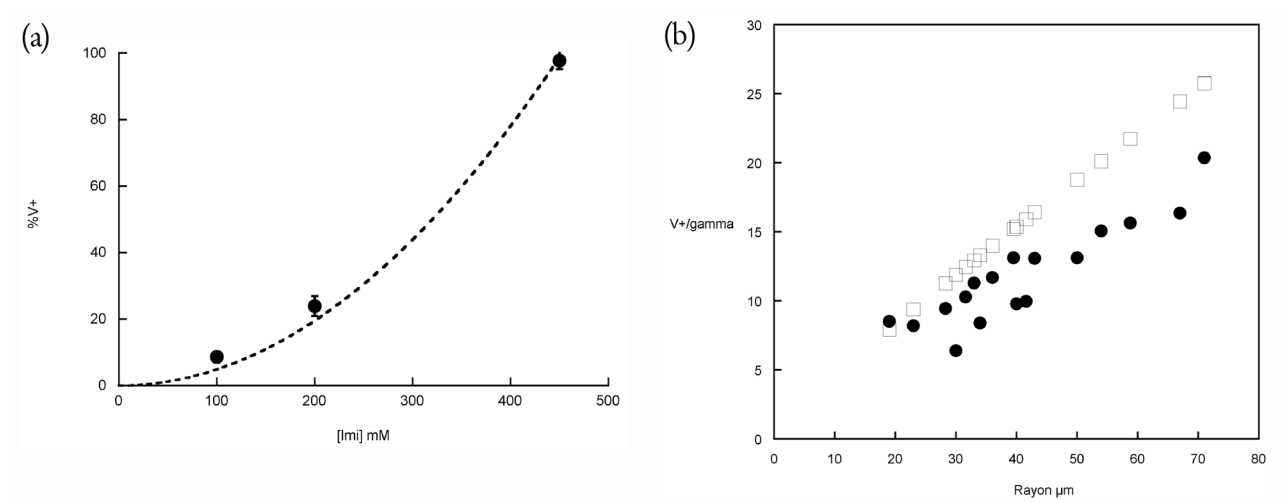


FIG. 9.34 – (a) : variation du pourcentage du nombre de régimes appartenant à V_+ , moyenné sur les rayons en fonction de la concentration en imidazole pour un cisaillement de $15.9 s^{-1}$. Les pointillés représentent un ajustement des points en loi de puissance, la puissance étant de 2. (b) : \bullet : variation des vitesses médianes (appartenant à la population V_+) renormalisées par le taux de cisaillement, en fonction du rayon des billes. \square : vitesse de Goldman calculée pour une hauteur de 50 nm.

Sur la figure 9.34 (b), on a reporté la variation de la vitesse médiane de la distribution v_+ pour chaque rayon, renormalisée par le taux de cisaillement, en fonction du rayon des billes. On observe une variation croissante de ce rapport avec le rayon. La courbe est assez bien définie, le bruit venant de la distribution des hauteurs. On remarque aussi, que globalement, ces vitesses sont très proches quoique légèrement inférieures à la vitesse de Goldman théorique tracée ici pour une hauteur de 50 nm.

Enfin, on a comparé le pourcentage de régimes appartenant à la population V_+ en fonction du cisaillement pour une concentration d'imidazole de 450 mM. Les vitesses sont moyennées sur les rayons des billes. La figure 9.35 montre cette variation.

On constate que pour une forte concentration en imidazole, seul un cisaillement faible permet d'obtenir des déplacements en adhésion. Pour des cisaillements de 15.9 et $34.9 s^{-1}$, le pourcentage de régimes appartenant à V_+ est de 100 %.

9.4.6 Régimes d'adhésion

Ces régimes sont caractérisés par des vitesses appartenant aux populations $V_{arrêt}$, V_- . Dans un premier temps, on a tracé le pourcentage du nombre de régimes se trouvant dans la population $V_{arrêt}$ en fonction du rayon en faisant varier la concentration en imidazole et la valeur du taux de cisaillement : figure 9.36. On observe clairement une décroissance du pourcentage des régimes appartenant à la population $V_{arrêt}$ en fonction du rayon des billes. Comme précédemment et comme lors des expériences de détachement, les billes les plus grosses sont soumises à une plus grande force hydrodynamique et vont avoir moins tendance

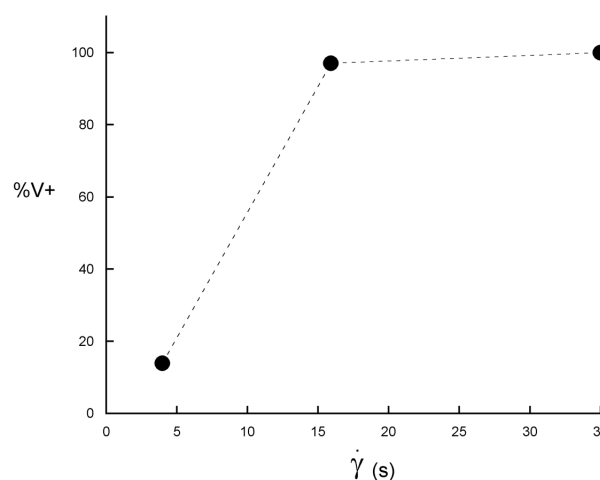


FIG. 9.35 – Variation du pourcentage du nombre de régimes dont les vitesses sont rangées dans la population V_+ en fonction du cisaillement pour une concentration en imidazole de 450 mM.

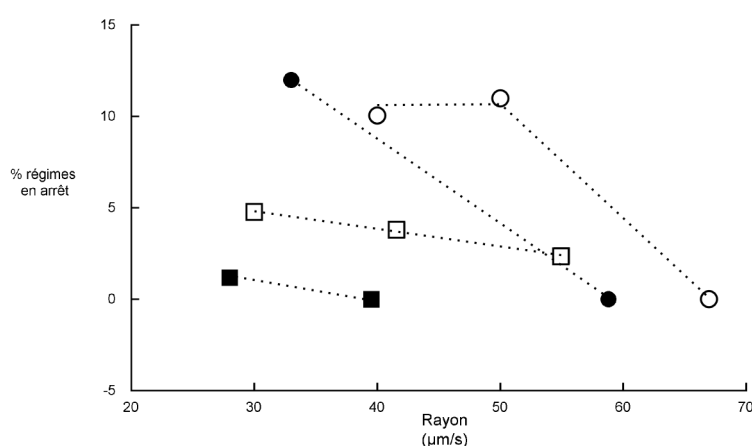


FIG. 9.36 – Variation du pourcentage des régimes appartenant à la population $V_{\text{arrêt}}$ en fonction du rayon des billes. Les ronds correspondent à un taux de cisaillement de 15.9 s^{-1} et les carrés correspondent à un taux de cisaillement de 34.9 s^{-1} . Les symboles en clair correspondent à une concentration en imidazole de 100 mM. Les symboles pleins correspondent à une concentration en imidazole de 200 mM.

à être arrêtées sur la surface. De plus, on constate qu'une augmentation du cisaillement induit une baisse du pourcentage : une augmentation du cisaillement entraîne une hausse des forces hydrodynamiques ressenties par les billes. Ainsi, en tirant plus fort sur les billes, on les oblige à être moins souvent adhérentes de façon ferme (vitesse nulle). Enfin, les symboles clairs, ($[\text{Imi}] = 100 \text{ mM}$), sont toujours au-dessus des symboles pleins ($[\text{Imi}] = 200 \text{ mM}$). L'imidazole influence directement le nombre de liens pouvant être formés entre le substrat et les billes. Une augmentation de la concentration en imidazole entraîne une baisse du nombre

de récepteurs sur les billes et favorise donc la déadhésion.

Dans un deuxième temps, on a observé la dépendance au rayon des vitesses médianes déterminées sur les histogrammes des billes appartenant à la population V_- . On a tracé la vitesse médiane en fonction du rayon pour les différents taux de cisaillement appliqués. Le résultat est présenté sur la figure 9.37. On n'observe pas de réelle tendance pour la variation de la

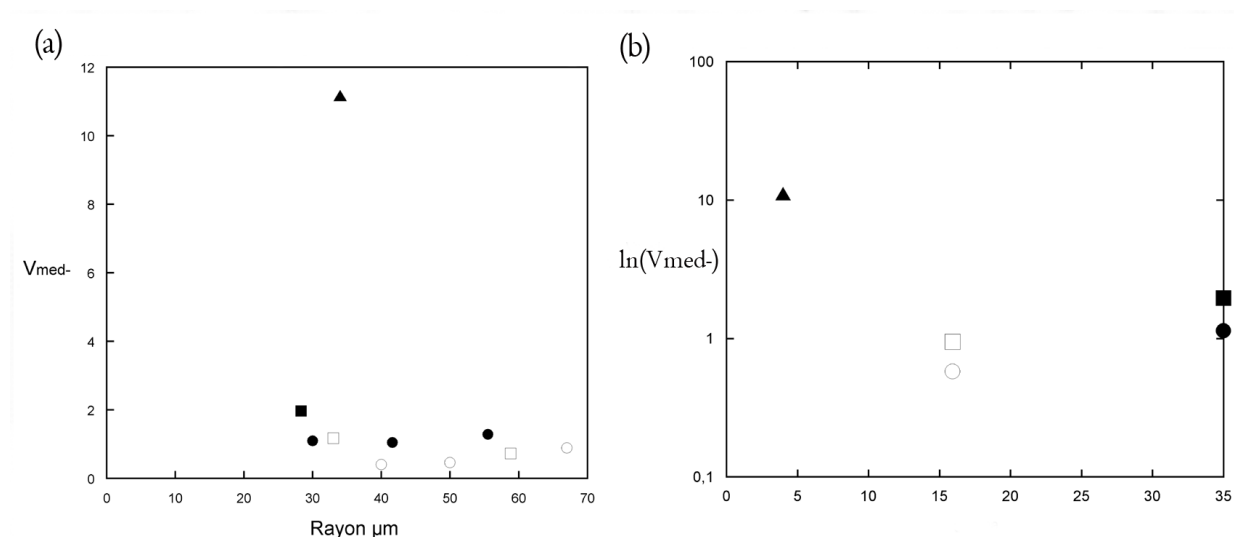


FIG. 9.37 – (a) : variation de la vitesse médiane déterminée sur les histogrammes de billes appartenant à la population V_- . (b) : évolution du logarithme de la vitesse médiane moyennée sur les rayons en fonction du taux de cisaillement pour différentes concentrations d'imidazole. Pour les deux images : ○ : $[Imi] = 100$ mM et $\dot{\gamma} = 15.9$ s $^{-1}$, □ : $[Imi] = 200$ mM et $\dot{\gamma} = 15.9$ s $^{-1}$, ● : $[Imi] = 100$ mM et $\dot{\gamma} = 34.98$ s $^{-1}$, ■ : $[Imi] = 200$ mM et $\dot{\gamma} = 34.98$ s $^{-1}$. ▲ : $[Imi] = 450$ mM et $\dot{\gamma} = 3.9$ s $^{-1}$

vitesse médiane en fonction du rayon. On moyenne alors les vitesses médianes, et on s'intéresse alors au rôle du taux de cisaillement sur les vitesses médianes. On a tracé la variation de cette moyenne en fonction du cisaillement appliqué pour les différentes concentrations d'imidazole utilisées (figure 9.37 (b)). Premièrement, on observe une légère augmentation de cette moyenne quand on augmente le cisaillement : une hausse du cisaillement augmente les forces hydrodynamiques et donc plus on tire sur la bille et plus elle va vite. Cet effet a déjà été observé [Rodgers et al., 2000], [Brunk and Hammer, 1997]. Ensuite, l'augmentation de la concentration en imidazole entraîne elle aussi une augmentation des vitesses moyennes. On peut supposer que l'augmentation de la concentration en imidazole va induire une baisse du nombre de liaisons qui s'accompagne alors de déplacements à des vitesses plus grandes. Pour des concentrations en imidazole de 450 mM, seul un flux de 3.9 s $^{-1}$ permet d'obtenir des vitesses en adhésion.

Il reste du travail pour analyser les histogrammes de distributions des temps des régimes, ainsi que la fréquence de changement de régime qui est directement reliée au nombre de régimes que nous déterminons. Ainsi, par exemple, on peut s'attendre, pour un cas de forte

adhésion, à ce que les billes se déplacent très lentement et changent rarement de régime. Par contre, si on ajoute de l'imidazole, alors, on peut se retrouver dans des cas où le nombre de changements de régime est maximal. Enfin, pour des concentrations élevées en imidazole, l'adhésion n'est presque plus possible et alors les objets vont se déplacer rapidement en changeant peu de régime.

9.4.7 Conclusion

En utilisant un unique couple récepteur/ligand et en faisant varier la quantité d'imidazole injectée, on a réussi à obtenir différents comportements de billes : des billes en adhésion très forte, qui sont arrêtées (vitesse nulle ou inférieure à $0.1 \mu\text{m/s}$), des billes présentant des déplacements en adhésion, et sans adhésion. Les expériences en RICM ont permis de définir un critère sur les vitesses permettant la caractérisation de l'état d'adhésion d'un objet : si la vitesse de déplacement est supérieure à 50 % de la vitesse de Goldman à une hauteur de 50 nm alors l'objet n'adhère pas, sinon il adhère. Cette étude a aussi mis en évidence le rôle des petites déformations des billes d'agarose et de la rugosité de ces billes, entraînant des fluctuations de la hauteur, fluctuations beaucoup moins importantes que celles observées sur les vésicules géantes.

Ce critère a ensuite permis l'étude du mouvement des billes sur des échelles de temps et d'espace plus grandes. Le déplacement des billes est découpé en suite de régimes qui sont rangés dans trois catégories en utilisant le critère précédemment cité : les régimes en non-adhésion sont rangés dans la population v_+ , les régimes en adhésion ferme sont rangés dans la population $V_{\text{arrêt}}$ et les autres vont dans la population V_- . L'étude du pourcentage des régimes rangés dans la population V_+ a montré qu'une augmentation de la concentration en imidazole augmente la population des régimes appartenant à V_+ , ces vitesses étant en accord avec Goldman (une augmentation du rayon des objets entraîne une augmentation de leur vitesse de déplacement). De plus, pour une concentration importante en imidazole (450 mM), on n'obtient des régimes en adhésion que pour un taux de cisaillement de 3.9 s^{-1} , la distribution des vitesses pour ces régimes d'adhésion à 450 mM étant alors analogue aux distributions de vitesses mesurées lors des expériences en RICM. L'effet de l'imidazole, du rayon et du cisaillement a aussi été mis en évidence pour les régimes de la population $V_{\text{arrêt}}$: le pourcentage du nombre de régimes de $V_{\text{arrêt}}$ décroît avec l'augmentation du rayon. Une augmentation du cisaillement et/ou de la concentration en imidazole fait décroître aussi ce pourcentage. Pour la population V_- , une augmentation du cisaillement se traduit par une légère augmentation de la vitesse médiane : en augmentant les contraintes hydrodynamiques, on augmente la force s'exerçant sur la bille et donc elle se déplace plus vite. Mais des questions restent ouvertes : pourquoi les vitesses médianes de la population V_- ne dépendent-elles pas du rayon, comment se comportent les distributions des temps d'existence des régimes pour les deux populations, comment le nombre de régimes est-il relié à la concentration en imidazole ? Il reste à comparer cela aux différents modèles existants.

9.5 Annexe : Méthode d'analyse de vitesses

Afin d'analyser les vitesses de déplacement des vésicules et des billes en adhésion, on se propose de caractériser le déplacement en identifiant des régimes sur lesquels la vitesse de déplacement est constante. La procédure de découpage du déplacement en suite de régimes à vitesse constante se déroule en trois étapes :

Estimation de l'incertitude sur la mesure Dans la plupart des cas, on isole une partie de la courbe pour laquelle l'objet est immobile et on détermine l'écart type σ sur la position. S'il n'existe pas d'endroits où la bille est immobile, on prend un déplacement linéaire et on détermine σ sur au minimum une vingtaine de points. On affecte alors une barre d'erreur sur le déplacement de $\pm 3\sigma$. On sait que pour une distribution normale, 99.7 % des points sont compris dans une fourchette de $\pm 3\sigma$. L'incertitude sur le temps correspond à la moitié du nombre d'images par seconde pris pour l'acquisition.

Trie des points Ensuite, on enlève les points qui sortent complètement du déplacement. Cela se produit notamment lors du suivi automatique des billes quand les billes rencontrent un obstacle où quand une autre bille passe à proximité. Puis, on peut encore enlever quelques points afin de supprimer les régimes à vitesses négatives, tant que le nombre de points enlevés reste dans la gamme autorisée (on peut enlever 0.3 % des points).

Détermination des régimes On considère les 2 premiers points du déplacement et on ajoute un troisième point. On effectue alors un ajustement linéaire afin de faire passer une droite par ces trois points. Si cette droite passe dans les barres d'erreurs de tous les points, alors on ajoute un nouveau point aux précédents et on refait un ajustement linéaire. Ainsi, de proche en proche, on ajoute des points tant que l'ajustement linéaire permet de faire passer une droite dans les barres d'erreurs de tous les points. Si l'ajout d'un nouveau point ne permet pas de faire passer une droite, alors les points ajustés définissent un régime qui est caractérisé par une vitesse, donnée par la pente de la droite, et par un temps d'existence du régime. Enfin, on recommence la détermination d'un nouveau régime sur les deux points d'après, et cela jusqu'à avoir parcouru tous les points.

Conclusions et Perspectives

Durant cette thèse, afin de décrire et comprendre les mouvements possibles pour un objet sous écoulement en adhésion spécifique avec un substrat, cet objet pouvant être déformable ou non, nous avons étudié les mouvements sous écoulement hydrodynamique de vésicules lipidiques géantes et de billes d'agarose recouvertes de nickel en adhésion spécifique. L'étude de l'interaction entre ces objets et une surface a été réalisée par le processus de chélation d'une molécule de nickel par deux molécules d'histidines (nous avons transposé cette interaction habituellement utilisée en biologie moléculaire pour la purification de protéines à l'étude des interactions d'adhésion spécifiques). L'intérêt majeur de cette interaction consiste à permettre la modulation de la force d'interaction par l'ajout en solution de molécules d'imidazole, partie complexante de l'histidine. Avec un unique couple ligand/récepteur, nous avons été capable de moduler les interactions d'adhésion des objets en écoulements avec la surface et d'obtenir différents comportements.

Dans un premier temps, nous nous sommes assurés de la présence d'histidines sur les substrats. Dans cette optique nous avons amélioré un dispositif expérimental existant permettant de faire de la Spectroscopie à corrélation de fluorescence sur substrat solide. Les premières tendances montrant une inhomogénéité des surfaces. La présence d'histidines sur les vésicules et les billes a été vérifiée par de la fluorescence. Ensuite, la mise en adhésion forte de vésicules sous écoulement a permis la visualisation de lignes de courants surfaciques sur les vésicules. Ces lignes de courants étant non planaires, asynchrones et évitant la zone de contact entre la vésicule et le substrat. Ces lignes de courants s'organisent autour de deux points de stagnation dont la position dépend de la force de l'adhésion.

Dans une seconde partie, nous avons étudié l'ajout progressif d'imidazole afin de permettre un détachement des billes soumises à un cisaillement. Cette étude originale a permis de mettre en évidence la présence d'une concentration seuil en imidazole permettant de détacher les billes. Ce détachement contrôlé des billes d'agarose est la signature de la spécificité de l'interaction entre les histidines sur la surface et le nickel des billes. De plus, les cinétiques de détachements obtenues sur deux surfaces identiques, ont permis de démontrer que l'inhomogénéité des surfaces mis en avant par les résultats obtenus par spectroscopie à corrélation de fluorescence n'influence pas de manière notable le comportement des billes.

La mise au point de programmes permettant le suivi automatique de billes en adhésion nous

a permis d'observer différents comportements. Nous nous sommes tout d'abord attachés à suivre la position des billes au cours du temps tout en mesurant la hauteur les séparant de la surface. Ces expériences réalisées par RICM ont montré qu'une bille sans interaction se déplace à une vitesse proportionnelle au cisaillement, mais avec une vitesse inférieure à la vitesse théorique de Goldman d'environ 20 %. La mesure des hauteurs ont mis en évidence une dépendance de la hauteur au cisaillement appliqué s'expliquant principalement par la déformabilité locale des billes. Or la perte de la sphéricité engendre une force de portance qui fait décoller la bille, dépendante du cisaillement. Par ailleurs, l'observation de billes en adhésion a mis en évidence différents régimes : un régime d'adhésion très forte où les hauteurs sont inférieures à 50 nm et où la bille ne fait que rouler, ainsi qu'un régime sans adhésion et enfin un régime d'adhésion faible présentant du roulement pur et du roulement avec glissement incompatible avec la théorie de Goldman. Cela nous a permis de définir un "critère d'adhésion" : si les vitesses mesurées sur le déplacement d'une bille sont inférieures à 50 % de la vitesse de Goldman calculée pour une hauteur de 50 nm, alors la bille est en adhésion. Sinon la bille se déplace sans être en interaction avec la surface. On a observé qu'une bille pouvait tout à fait présenter ces différents régimes lors de son mouvement.

Ensuite des expériences furent menées sur le déplacement de billes en microscopie classique. On a observé des comportements riches et variés où les billes se déplacent en adhésion avec une vitesse de déplacement non constante. Ces expériences nous ont permis d'établir une méthode d'analyse de ces déplacements en découpant les déplacements en suite de régimes à vitesse constante. Le "critère d'adhésion" nous permet de ranger ces régimes dans deux populations distinctes : une population V_+ où les déplacements ne présentent pas d'adhésion et une population V_- où les déplacements se font en adhésion. Les premières analyses ont montré que le pourcentage de vitesses appartenant à la population V_+ dépend de la concentration en imidazole et que les vitesses dépendent du rayon des billes. Par contre, les vitesses appartenant à la population V_- dépendent peu du rayon des billes mais du cisaillement appliqué : en augmentant la force hydrodynamique, les billes se déplacent plus vite.

L'une des perspectives de ce travail est d'arriver à quantifier le nombre de molécules d'histidines présentes sur le substrat et de s'assurer qu'elles sont réparties de façon homogènes. Une autre perspective est de comprendre comment les différents régimes de vitesse se répartissent entre les trois populations en fonction du cisaillement, du rayon des billes et de la concentration en imidazole, et d'arriver à obtenir les mêmes types de comportements de façon reproductible sur des vésicules géantes afin de tester le rôle de la déformabilité de l'objet et de la mobilité des sites d'adhésion dans l'adhésion. Dans les cas d'adhésion forte des vésicules, il serait aussi intéressant d'observer les mouvements locaux des lipides dans la zone de contact, que l'on considère fixe, à l'aide par exemple de techniques comme le Fluorescence Recovery After Photobleaching ou d'observer l'effet que peut avoir une membrane visco-élastique sur les lignes de courant ou d'un gel encapsulé par la vésicule qui serait ancré ou non dans la membrane. Pour les billes d'agarose, les cisaillements employés sont au maximum de 35 s^{-1} . On pourrait essayer d'appliquer des flux plus importants sur les billes en adhésion forte afin de tester leur comportements à très fort taux de cisaillement, ces flux pouvant être appliqués en confinant les billes dans des canaux microfluidiques.

Bibliographie

- [Abkarian et al., 2001] Abkarian, M., Lartigue, C., and Viallat, A. (2001). Motion of phospholipidic vesicles along an inclined plane : sliding and rolling. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, 63(4 Pt 1) :041906.
- [Abkarian et al., 2002] Abkarian, M., Lartigue, C., and Viallat, A. (2002). Tank treading and unbinding of deformable vesicles in shear flow : determination of the lift force. *Phys Rev Lett*, 88(6) :068103.
- [Abkarian and Viallat, 2005] Abkarian, M. and Viallat, A. (2005). Dynamics of vesicles in a wall-bounded shear flow. *Biophys J*, 89(2) :1055–1066.
- [Alon et al., 1995] Alon, R., Hammer, D. A., and Springer, T. A. (1995). Lifetime of the p-selectin-carbohydrate bond and its response to tensile force in hydrodynamic flow. *Nature*, 374(6522) :539–542.
- [Angelova et al., 1992] Angelova, M. I., Soléau, S., Méléard, P., Faucon, J. F., and Bothorel, P. (1992). Preparation of giant vesicles by external ac electric fields. kinetics and applications. *Progr. Colloid Polym. Sci.*, 89 :127–131.
- [Bell, 1978] Bell, G. I. (1978). Models for the specific adhesion of cells to cells. *Science*, 200(4342) :618–627.
- [Blancquaert, 2006] Blancquaert, Y. (2006). *Nouvelles géométries optiques pour la Spectroscopie ? Corrélation de Fluorescence*. PhD thesis, Université Joseph Fourier.
- [Bongrand, 1999] Bongrand, P. (1999). Ligand-receptor interactions. *Reports on Progress in Physics*, 62 :921–968.
- [Brochard-Wyart et al., 2006] Brochard-Wyart, F., Borghi, N., Cuvelier, D., and Nassoy, P. (2006). Hydrodynamic narrowing of tubes extruded from cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(20) :7660–7663.
- [Brochard-Wyart and de Gennes, 2002] Brochard-Wyart, F. and de Gennes, P.-G. (2002). Adhesion induced by mobile binders : dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(12) :7854–7859.
- [Brunk and Hammer, 1997] Brunk, D. K. and Hammer, D. A. (1997). Quantifying rolling adhesion with a cell-free assay : E-selectin and its carbohydrate ligands. *Biophysical Journal*, 72 :2820–2833.

- [Cantat and Misbah, 1999] Cantat, I. and Misbah, C. (1999). Lift force and dynamical unbinding of adhering vesicles under shear flow. *Phys. Rev. Lett.*, 83 :880–883.
- [Caputo and Hammer, 2005] Caputo, K. E. and Hammer, D. A. (2005). Effect of microvillus deformability on leukocyte adhesion explored using adhesive dynamics simulations. *Biophys J*, 89(1) :187–200.
- [Chang et al., 2000] Chang, K. C., Tees, D. F., and Hammer, D. A. (2000). The state diagram for cell adhesion under flow : leukocyte rolling and firm adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(21) :11262–11267.
- [Chen et al., 1999] Chen, Y., Müller, J. D., So, P. T. C., and Gratton, E. (1999). The photon counting histogram in fluorescence fluctuation spectroscopy. *Biophysical Journal*, 77 :553.
- [Cozens-Roberts et al., 1990a] Cozens-Roberts, C., Lauffenburger, D. A., and Quinn, J. A. (1990a). Receptor-mediated cell attachment and detachment kinetics. i. probabilistic model and analysis. *Biophys J*, 58(4) :841–856.
- [Cozens-Roberts et al., 1990b] Cozens-Roberts, C., Quinn, J. A., and Lauffenburger, D. A. (1990b). Receptor-mediated adhesion phenomena. model studies with the radial-flow detachment assay. *Biophys J*, 58(1) :107–125.
- [Cozens-Roberts et al., 1990c] Cozens-Roberts, C., Quinn, J. A., and Lauffenburger, D. A. (1990c). Receptor-mediated cell attachment and detachment kinetics. ii. experimental model studies with the radial-flow detachment assay. *Biophys J*, 58(4) :857–872.
- [Crocker and Grier, 1996] Crocker, J. C. and Grier, D. G. (1996). Methods of Digital Video Microscopy for Colloidal Studies. *J. Colloid Interface Sci.*, 179 :298–310.
- [Cuvelier et al., 2004] Cuvelier, D., Vézy, C., Viallat, A., Bassereau, P., and Nassoy, P. (2004). Mimicking cell/extracellular matrix adhesion with lipid membranes and solid substrates : Requirements, pitfalls and proposals. *Journal of Physics : Condensed Matter*, 16 :2427–2437.
- [Décavé et al., 2002] Décavé, E., Garrivier, D., Bréchet, Y., Fourcade, B., and Bruckert, F. (2002). Shear flow-induced detachment kinetics of dictyostelium discoideum cells from solid substrate. *Biophys J*, 82(5) :2383–2395.
- [de Haas et al., 1997] de Haas, K. H., Blom, C., van den Ende, D., Duits, M. H. G., and Mellema, J. (1997). Deformation of giant lipid bilayer vesicles in shear flow. *Phys. Rev. E*, 56(6) :7132–7137.
- [Delon et al., 2006] Delon, A., Derouard, J., and Delapierre, G. (2006). Measurement of surface concentration of fluorophore by fluorescence fluctuation spectroscopy. *Opt. Lett.*, 31 :1142–1144.
- [Dembo et al., 1988] Dembo, M., Torney, D. C., Saxman, K., and Hammer, D. (1988). The reaction-limited kinetics of membrane-to-surface adhesion and detachment. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 234(1274) :55–83.
- [Derouard et al., 2006] Derouard, J., Delon, A., Jaffiol, R., and C. Vézy (2006). Application of fluorescence fluctuation spectroscopy to the measurement of the concentration of molecules deposited on solid substrates. In *Proc. SPIE "Biophotonics and new therapy frontier"*, volume 6191.

- [Dimitrakopoulos and Higdon, 1998] Dimitrakopoulos, P. and Higdon, J. (1998). On the displacement of three-dimensional fluid droplets from solid surfaces in low-reynolds-number shear flows. *J. Fluid Mech.*, 377 :189–222.
- [Dimitrakopoulos and Higdon, 1997] Dimitrakopoulos, P. and Higdon, J. J. L. (1997). Displacement of fluid droplets from solid surfaces in low-reynolds-number shear flows. *J. Fluid Mech.*, 336 :351–378.
- [Evans et al., 1991] Evans, E., Berk, D., and Leung, A. (1991). Detachment of agglutinin-bonded red blood cells. i. forces to rupture molecular-point attachments. *Biophys J*, 59(4) :838–848.
- [Evans et al., 2001] Evans, E., Leung, A., Hammer, D., and Simon, S. (2001). Chemically distinct transition states govern rapid dissociation of single l-selectin bonds under force. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 :3784–3789.
- [Evans and Ritchie, 1997] Evans, E. and Ritchie, K. (1997). Dynamic strength of molecular adhesion bonds. *Biophys J*, 72(4) :1541–55.
- [Fischer et al., 1978] Fischer, T., Stöhr-Liesen, M., and Schmid-Schönbein, H. (1978). The red blood cell as a fluid droplet : tank tread-like motion of the human erythrocyte membrane in shear flow. *Science*, 202 :894–896.
- [Garrivier et al., 2002] Garrivier, D., Décavé, E., Bréchet, Y., Bruckert, F., and Fourcade, B. (2002). Peeling model for cell detachment. *Eur Phys J E Soft Matter*, 8(1) :79–97.
- [Goldman et al., 1967] Goldman, A. J., Cox, R. G., and Brenner, H. (1967). Slow viscous motion of a sphere parallel to a plane wall-i motion through a quiescent fluid. *Chemical Engineering Science*, 22 :636–651.
- [Greenberg et al., 2000] Greenberg, A. W., Brunk, D. K., and Hammer, D. A. (2000). Cell-free rolling mediated by l-selectin and sialyl lewis(x) reveals the shear threshold effect. *Biophys J*, 79(5) :2391–2402.
- [H. Noji et al., 1997] H. Noji, R. Yasuda, M. Yoshida, and K. Kinosita (1997). Direct observation of the rotation of f1 atpase. *Nature*, 386 :299–302.
- [Hamaker, 1937] Hamaker, H. (1937). The london-van der waals attraction between spherical particles. *Physica*, 4 :1058–1072.
- [Hammer and Lauffenburger, 1987] Hammer, D. A. and Lauffenburger, D. A. (1987). A dynamical model for receptor-mediated cell adhesion to surfaces. *Biophys J*, 52(3) :475–487.
- [Helfrich, 1973] Helfrich, W. (1973). Elastic properties of lipid bilayers : theory and possible experiments. *Z Naturforsch [C]*, 28(11) :693–703.
- [Hochuli et al., 1987] Hochuli, E., Doebeli, H., and Schacher, A. (1987). New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *Journal of Chromatography*, 411(411) :177–184.
- [Israelachvili, 1992] Israelachvili, J. (1992). *Intermolecular and Surface Forces*. Academic Press.
- [J. N. Israelachvili and G. E. Adams, 1978] J. N. Israelachvili and G. E. Adams (1978). Measurement of Forces between two Mica surfaces in Aqueous Electrolyte Solutions in the Range 0-100 nm. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 74 :975–1001.

- [Jacques Pécereaux, 2004] Jacques Pécereaux (2004). *Mesure du spectre de fluctuations de vésicules géantes par analyse de contours ; application aux membranes passives et actives*. PhD thesis, Université Paris.
- [Johnson et al., 1971] Johnson, K. L., Kendall, K., and Roberts, A. D. (1971). Surface energy and the contact of elastic solids. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. A.*, 324 :301–313.
- [Kaplansky et al., 1993] Kaplansky, G., Farnarier, C., Tissot, O., Pierres, A., Benoliel, A. M., Alessi, M. C., Kaplanski, S., and Bongrand, P. (1993). Granulocyte-endothelium initial adhesion. analysis of transient binding events mediated by e-selectin in a laminar shear flow. *Biophys. J.*, 64 :1922–1933.
- [Keller and Skalak, 1982] Keller, S. and Skalak, R. (1982). A tank treading ellipsoidal particle in a shear flow. *J. Fluid Mech.*, 120 :27–47.
- [Kienberger et al., 2006] Kienberger, F., Ebner, A., Gruber, H. J., and Hinterdorfer, P. (2006). Molecular recognition imaging and force spectroscopy of single biomolecules. *Acc Chem Res*, 39(1) :29–36.
- [Kienberger et al., 2000] Kienberger, F., Kada, G., Gruber, H. J., Pastushenko, V. P., Riemer, C., Trieb, M., Knaus, H.-G., H. Schindler, and P. Hinterdorfer (2000). Recognition Force Spectroscopy Studies of the NTA-His6 Bond. *Single Molecules*, 1 :59–65.
- [King and Hammer, 2001] King, M. R. and Hammer, D. A. (2001). Multiparticle adhesive dynamics. interactions between stably rolling cells. *Biophys J*, 81(2) :799–813.
- [Kraus et al., 1996] Kraus, M., W. Wintz, Seifert, U., and Lipowsky, R. (1996). Fluid vesicles in shear flow. *Phys. Rev. Lett.*, 77 :3685–3688.
- [L. Schmitt et al., 2000] L. Schmitt, M. Ludwig, H. E. Gaub, and R. Tampé (2000). A Metal-Chelating Microscopy Tip as a New Toolbox for Single-Molecule Experiments by Atomic Force Microscopy. *Biophysical Journal*, 78 :3275–3285.
- [Laure Wawrezinieck, 2006] Laure Wawrezinieck (2006). *Confinement moléculaire et organisation de la membrane des cellules vivantes : analyse de la diffusion par spectroscopie de corrélation de fluorescence*. PhD thesis, Université Aix-Marseille II.
- [Lide, 2005] Lide, D. R. . (2005). *Handbook of Chemistry and Physics, 85th Ed.* CRC Press, Boca Raton, FL.
- [Lipowsky and Seifert, 1991] Lipowsky, R. and Seifert, U. (1991). Adhesion of Vesicles and Membranes. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, 202 :17–25.
- [Lorz et al., 2000] Lorz, B., Simson, R., Nardi, J., and Sackmann, E. (2000). Weakly adhering vesicles in shear flow : Tanktreading and anomalous lift force. *Europhysics Letters*, 51 :468–474.
- [M. Conti et al., 2000] M. Conti, G. Falini, and B. Samorì (2000). How Strong Is the Coordination Bond between a Histidine Tag and Ni-Nitrilotriacetate ? An Experiment of Mechanochemistry on Single Molecules. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 39(1) :215–218.
- [M. K. Wild et al., 2001] M. K. Wild, Min-Chuan Huang, and U. Schulze-Horsel (2001). Affinity, Kinetics and Thermodynamics of E-selectin Binding to E-selectin Ligand-1. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(34) :31602–31612.

- [Magde et al., 1978] Magde, D., Webb, W. W., and Elson, E. L. (1978). Fluorescence correlation spectroscopy. iii. uniform translation and laminar flow. *Biopolymers*, 17 :361.
- [Merkel et al., 1999] Merkel, R., Nassoy, P., Leung, A., Ritchie, K., and Evans, E. (1999). Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy. *Nature*, 397(6714) :50–53.
- [Miyamoto S. and Kollman P. A., 1993] Miyamoto S. and Kollman P. A. (1993). Absolute and relative binding free-energy calculations of the interaction of biotin and its analogs with streptavidin using molecular-dynamics free-energy perturbation approaches. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics*, 16 :226–245.
- [Müller, 2004] Müller, J. D. (2004). Cumulant analysis in fluorescence fluctuation spectroscopy. *Biophysical Journal*, 86 :3981–3992.
- [Moy et al., 1999] Moy, V. T., Jiao, Y., Hillmann, T., Lehmann, H., and Sano, T. (1999). Adhesion energy of receptor-mediated interaction measured by elastic deformation. *Biophys J*, 76(3) :1632–1638.
- [Olla, 1997] Olla, P. (1997). The lift on a tank-treading ellipsoidal cell in a shear flow. *J. Phys. II France*, 7 :1533–1540.
- [P. Schwille and E. Haustein, 2004] P. Schwille and E. Haustein (2004). Fluorescence correlation spectroscopy : An introduction to its concepts and applications.
- [Perret et al., 2002] Perret, E., Benoliel, A.-M., Nassoy, P., Pierres, A., Delmas, V., Thiery, J.-P., Bongrand, P., and Feracci, H. (2002). Fast dissociation kinetics between individual e-cadherin fragments revealed by flow chamber analysis. *EMBO J*, 21(11) :2537–2546.
- [Pierrat, 2004] Pierrat, S. (2004). *Etude de l'adhésion cellulaire à différentes échelles : de la molécule unique à la cellule*. PhD thesis, Université Paris VI.
- [Pierres et al., 1995] Pierres, A., Benoliel, A. M., and Bongrand, P. (1995). Measuring the lifetime of bonds made between surface-linked molecules. *J Biol Chem*, 270(44) :26586–26592.
- [Pierres et al., 2002] Pierres, A., Touchard, D., Benoliel, A.-M., and Bongrand, P. (2002). Dissecting streptavidin-biotin interaction with a laminar flow chamber. *Biophys J*, 82(6) :3214–3223.
- [Pierres et al., 2006] Pierres, A., Vitte, J., Benoliel, A., and Bongrand, P. (2006). Dissecting individual ligand-receptor bonds with a laminar flow chamber. *Biophysical Reviews and Letters*, 1(3) :231–257.
- [Puech, 2003] Puech, P. H. (2003). *Vésicules géantes décorées - adhésion et transport-*. PhD thesis, Université Paris VI.
- [R. J. Sundberg and R. B. Martin, 1974] R. J. Sundberg and R. B. Martin (1974). Interactions of Histidine and Other Imidazole Derivatives with TransitionMetal Ions in Chemical and Biological Systems. *Chemical Reviews*, 74(4) :471–517.
- [R. Lipowsky and E. Sackmann, 1995] R. Lipowsky and E. Sackmann (1995). *From Cells to Vesicles, volume 1A of Structure and dynamics of membranes*. Elsevier sciences BV.
- [R. M. C. Dawson et al., 1968] R. M. C. Dawson, D. C. Elliott, and W. H. Elliott (1968). *Data for biochemical Research*. Oxford University Press, USA.

- [Raphaël Lévy, 2002] Raphaël Lévy (2002). *Interactions intra et intermoléculaires, conformation des polymères adsorbés, transitions de phases sous étirement : Que peut-on apprendre des mesures de force ?* PhD thesis, Université Louis Pasteur Strasbourg.
- [Razpet et al., 2000] Razpet, A., Gomiscek, G., Arrigler, V., Svetina, S., and Zeks, B. (2000). Rotation of giant phospholipid vesicles in an uniform shear flow. *Pflugers Arch*, 439(3 Suppl) :R141–R142.
- [Rädler et al., 1995] Rädler, Feder, Strey, and Sackmann (1995). Fluctuation analysis of tension-controlled undulation forces between giant vesicles and solid substrates. *Physical Review E*, 51(5) :4526–4536.
- [Rädler and Sackmann, 1993] Rädler, O. and Sackmann, E. (1993). Imaging optical thicknesses and separation distances of phospholipid vesicles at solid surfaces. *J. Phys II France*, 3 :727–748.
- [Rodgers et al., 2000] Rodgers, S. D., Camphausen, R. T., and Hammer, D. A. (2000). Sialyl lewis(x)-mediated, psgl-1-independent rolling adhesion on p-selectin. *Biophys J*, 79(2) :694–706.
- [Sandre, 2000] Sandre, O. (2000). *Pores transitoires, adhésion et fusion des vésicules géantes*. PhD thesis, Université Paris VI.
- [Sandre et al., 1999] Sandre, O., Moreaux, L., and Brochard-Wyart, F. (1999). Dynamics of transient pores in stretched vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(19) :10591–6.
- [Schilling et al., 2004] Schilling, J., Sengupta, K., Goennenwein, S., Bausch, A. R., and Sackmann, E. (2004). Absolute interfacial distance measurements by dual-wavelength reflection interference contrast microscopy. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, 69(2 Pt 1) :021901.
- [Secomb and Skalak, 1982] Secomb, T. W. and Skalak, R. (1982). Surface flow of viscoelastic membranes in visous fluids. *Q. J. Mech. Appl. Math.*, 35 :233–247.
- [Seifert, 1999] Seifert, U. (1999). Hydrodynamics lift on bound vesicle. *Phys. Rev. Lett.*, 83(4) :876–879.
- [Sivasankar et al., 1999] Sivasankar, S., Briehner, W., Lavrik, N., Gumbiner, B., and Leckband, D. (1999). Direct molecular force measurements of multiple adhesive interactions between cadherin ectodomains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(21) :11820–4.
- [Sivasankar et al., 2001] Sivasankar, S., Gumbiner, B., and Leckband, D. (2001). Direct measurements of multiple adhesive alignments and unbinding trajectories between cadherin extracellular domains. *Biophys J*, 80(4) :1758–68.
- [Stout, 2001] Stout, A. L. (2001). Detection and characterization of individual intermolecular bonds using optical tweezers. *Biophysical Journal*, 80 :2976–2986.
- [Sukumaran and Seifert, 2001] Sukumaran, S. and Seifert, U. (2001). Influence of shear flow on vesicles near a wall : A numerical study. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, 64(1 Pt 1) :011916.
- [Tareste, 2002] Tareste, D. (2002). *Liaisons par chélation et liaisons hydrogènes : une mesure directe*. PhD thesis, Université Paris VI.

-
- [Thoumine et al., 1996] Thoumine, O., Ott, A., and Louvard, D. (1996). Critical centrifugal forces induce adhesion rupture or structural reorganization in cultured cells. *Cell Motil Cytoskeleton*, 33(4) :276–287.
- [Webb, 2001] Webb, W. W. (2001). Fluorescence correlation spectroscopy : inception, biophysical experimentation, and prospectus. *Appl. Opt.*, 40 :3969.
- [Wong et al., 1997] Wong, J. Y., Kuhl, T. L., Israelachvili, J. N., Mullah, N., and Zalipsky, S. (1997). Direct measurement of a tethered ligand-receptor interaction potential. *Science*, 275(5301) :820–2.
- [Y. Tominaga et al., 1998] Y. Tominaga, Y. Kita, A. Satoh, S. Asai, K. Kato, K. Ishikawa, T. Horiuchi, and T. Takashi (1998). Affinity and Kinetic Analysis of the Molecular Interaction of ICAM-1 and Leukocyte Function-Associated Antigen-1. *Journal of Immunology*, 161 :4016–4022.
- [Zhu et al., 2002] Zhu, C., Long, M., Chelsa, S. E., and Bongrand, P. (2002). Measuring receptor/ligand interaction at the single-bond level : Experimental and interpretative issues. *Annals of Biomedical Engineering*, 30 :305–314.

Table des figures

1.1	A gauche image d'un leucocyte en adhésion sur la paroi endothéliale. Le flux déforme le leucocyte. A droite représentation schématique des différentes étapes de la réponse inflammatoire : le leucocyte adhère aux parois activées par la présence de l'inflammation. Le leucocyte roule sur la paroi et est freiné. Enfin, il est accroché fermement et migre vers le lieu de l'inflammation.	11
2.1	Schéma présentant différents paramètres jouant un rôle dans l'adhésion cellule-cellule ou cellule-substrat. Nous avons listé quelques paramètres : (a) : la force extérieure, ici un cisaillement, (b) : le paysage énergétique de la liaison, (c) : la spécificité de l'interaction, (d) : l'accessibilité des ligands et des récepteurs et la diminution des interactions non spécifiques par l'ajout d'espaceurs sur la surface ou sur la cellule (e) ou encore la rugosité de la surface ou la composition de la membrane lipidique (f).	17
2.2	Représentation schématique de deux surfaces chargées négativement plongées dans une solution d'électrolyte.	19
2.3	Potentiel d'interaction d'une bicouche lipidique proche d'une surface.	21
2.4	Probabilité de rupture en fonction de la force normalisée par f_β pour un taux de charge croissant (d'après [Pierrat, 2004])	24
2.5	Principe de la BFP et spectre dynamique de force obtenu pour la liaison entre un ligand carbohydre et la L-Sélectine	26
2.6	Principe du fonctionnement d'un AFM pour la mesure de forces	27
2.7	Principe de la chambre à flux	28
2.8	Définition des paramètres du système : V est la vitesse de translation de la bille de rayon R soumise à un cisaillement $\dot{\gamma}$, ω est sa vitesse de rotation. Le bas de la sphère se trouve à une distance δ du substrat.	29
2.9	La force de portance décolle les vésicules de la surface	33
2.10	Schéma de la modélisation du détachement cellulaire proposé par Dembo et coll (d'après [Dembo et al., 1988]).	35
2.11	Schéma décrivant la zone adhésive proche de la ligne de contact et le potentiel énergétique utilisés dans le modèle de peeling de Garrivier et ses coll. . .	36

2.12	Schéma représentant l'adhésion d'une cellule à une surface d'après Hammer et diagramme d'état	38
2.13	Représentation schématique d'une bille en adhésion sur une surface. a est le rayon de la longueur de contact, R est le rayon de la bille. H est la distance maximale de formation d'un lien.	39
3.1	Chélation d'un ion nickel (Ni^{2+}) par deux histidines et un groupement NTA.	45
3.2	Structure d'une vésicule	49
3.3	Image d'une vésicule contenant deux phases.	50
3.4	Une vésicule sphérique et une vésicule dégonflée.	51
4.1	DOPC	54
4.2	DOGS-NTA-Ni	54
4.3	Vésicule vue en contraste de phase	55
4.4	Vue d'une bille par champ clair, DIC et RCM	56
4.5	Distribution de taille des billes d'agarose recouvertes de nickel déterminée à partir de la mesure du diamètre de 1065 billes. On a reporté le pourcentage de billes présentant un rayon donné en fonction du rayon mesuré. La courbe rouge est un ajustement de la distribution par une loi log-normale.	56
4.6	Processus de greffage du peptide	59
5.1	(a) : Volume confocal d'observation (en rose) dans lequel des particules (ronds noirs) sont illuminées par le faisceau laser (en vert). Le volume d'observation est la région de l'espace dans laquelle les molécules fluorescentes sont à la fois excitées et détectées. (b) : Le signal $F(t)$ à un temps t est corrélé avec lui-même à un temps $t+\tau$ afin de calculer l'autocorrélation des fluctuations de fluorescence $G(\tau)$	63
5.2	Montage expérimental pour les expériences de FCS	65
5.3	Schéma présentant les balayages réalisés sur nos surfaces	66
5.4	Nombre de photons comptés en kHz au cours d'un scan de 23 s.	66
5.5	Scan présentant un gradient selon la direction Y.	67
5.6	Spectre d'absorption et d'émission du ProQSapphire 488	68
5.7	Correspondance entre la présence d'un "burst" dans le taux de comptage (CR) et un nombre de molécules proche de 0	69
5.8	Corrélation entre le signal de fluorescence enregistré et le nombre de molécules calculé par la méthode des cumulants.	71
5.9	Courbes d'étalonnage de la fluorescence du PQS	73
5.10	Vésicules électroformées avec 20 % de lipide NTA-Ni et billes d'agarose chélatantes rendues fluorescentes par reconnaissance spécifique entre le nickel et les histidines du peptide modifié.	74
5.11	Intensité de fluorescence de vésicules recouvertes de nickel et incubées dans une solution de AV20KH-FITC. La fluorescence représentée est la différence entre la fluorescence mesurée au centre de la vésicule et la fluorescence mesurée en dehors de la vésicule.	74
6.1	Principe de la microscopie à contraste de phase.	76

6.2	Vésicules observées par microscopie à contraste de phase	77
6.3	Principe du RICM	78
6.4	Observation d'une vésicule adhérente en RICM et son profil d'intensité.	79
6.5	Dimension de la chambre de flux pour la vue de côté.	80
6.6	Microscope couché.	80
6.7	A : Représentation de l'évolution linéaire de la vitesse des billes en fonction de la distance à la surface (en vue de dessus). La pente donne la mesure du taux de cisaillement $\dot{\gamma}$. B : Calibration du taux de cisaillement $\dot{\gamma}$ en fonction d'un débit arbitrairement imposé.	81
7.1	(a) : Image de vésicules vues en contraste de phase. (b) : Application du filtre <i>bpass</i> sur (a).	84
7.2	A : définition de la table d'orientation. B : exemple du calcul de la matrice d'orientation pour l'orientation 1. Si l'on se trouve au pixel <i>a</i> avec l'orientation 1, alors le pixel devant à la droite de <i>a</i> est le pixel <i>d</i> . Le pixel <i>d</i> se trouve en (x+1,y+1) par rapport au pixel <i>a</i> . Ainsi la matrice d'orientation dev-drte-x pour l'orientation 1 vaut 1 car on est en x+1 et celle de dev-drte-y vaut 1 car on est en y+1. De même, la matrice dev-x va valoir 0 car le pixel devant <i>a</i> qui est <i>c</i> est à même x mais la matrice dev-y va valoir 1 car <i>c</i> est en y+1. C : exemple du calcul de la matrice d'orientation pour l'orientation 0. Par un raisonnement identique, la matrice dev-drte-x vaudra 1 car le pixel devant à droite de <i>c</i> est <i>b</i> se trouvant en x+1 et la matrice dev-drte-y vaudra -1 car <i>b</i> est en y-1.	85
7.3	Algorithme du programme permettant la détection du contour d'un objet ayant une forme quelconque.	86
7.4	Exemples de détermination de contours.	87
7.5	Diagramme représentant de façon simplifiée l'algorithme de suivi automatique des billes pour une séquence d'images.	88
7.6	Traitement et calcul du centre de gravité d'une bille de 29 μm de rayon se déplaçant lentement sous l'effet d'un cisaillement hydrodynamique.	89
7.7	Traitement et calcul du centre de gravité d'une bille de 74 μm de rayon se déplaçant lentement sous l'effet d'un cisaillement hydrodynamique.	89
7.8	Traitement et calcul du centre de gravité d'une bille de 45.5 μm de rayon se déplaçant sous l'effet d'un cisaillement hydrodynamique.	90
7.9	Algorithme permettant le suivi automatique de l'aire de contact au cours du temps pour une bille recouverte de nickel se déplaçant sur une surface fonctionnalisée en histidine.	90
7.10	A : image en RICM d'une bille d'agarose en adhésion. B : détermination de l'aire de la zone d'adhésion de la bille de l'image A.	91
7.11	A : Algorithme permettant de suivre automatiquement le centre de gravité d'une bille observée en RICM à partir des franges d'interférences. B : exemple de profil radial intégré à partir des cercles concentriques.	92
8.1	Vue de côté de la Ves4 soumise à un écoulement de cisaillement selon la direction x.	95

8.2	Vue de dessus de la Ves5 soumise à un écoulement de cisaillement en vue de dessus.	95
8.3	Représentation schématique de la sélection des vésicules présentant des défauts internes.	97
8.4	Trajectoire du défaut et reconstruction des lignes de courant pour 3 vésicules.	98
8.5	Variation de l'angle θ en fonction du rapport d'aspect $L/2R$. La ligne pointillée est un guide pour les yeux.	99
8.6	Evolutions typiques des coordonnées x (cercles noirs) et y (carrés blancs)	99
8.7	Variation linéaire de la vitesse angulaire ω d'un défaut en fonction du taux de cisaillement $\dot{\gamma}$ observé sur des orbites fixes.	101
8.8	Variation de la vitesse angulaire réduite $\omega/\dot{\gamma}$ pour un défaut en fonction de la distance curvilinéaire adimensionnée $s^* = s/s_0$	101
8.9	Variation de la vitesse angulaire réduite extrapolée au point de stagnation et au sommet de la vésicule.	102
8.10	Lignes de courant d'une goutte en adhésion sur un substrat soumise à un écoulement de cisaillement. Les flèches représentent le champ des vitesses des lignes de courant. (Pozrikidis : communication personnelle)	103
9.1	Déplacement linéaire de la vésicule 6. \square : $\dot{\gamma} = 0.4 \text{ s}^{-1}$, \triangle : $\dot{\gamma} = 0.66 \text{ s}^{-1}$ et \circ : $\dot{\gamma} = 0.93 \text{ s}^{-1}$	108
9.2	(a) : Histogramme des hauteurs calculées pour les vésicules 1 à 7 à partir de la mesure des vitesses de déplacement. (b) : pour les vésicules 1 à 7. Les \square sont tirés du papier [Abkarian and Viallat, 2005]. Les pointillés représentent l'équation de Goldman 2.28 pour une hauteur de $2.4 \mu\text{m}$	108
9.3	Variation de la hauteur séparant les vésicules de la surface en fonction du taux de cisaillement appliqué. Les pointillés sont des ajustements linéaires. \circ : vésicule 1, \square : vésicule 2, \triangle : vésicule 3, \times : vésicule 4, \bullet : vésicule 5, \blacksquare : vésicule 6, \blacktriangle : vésicule 7.	109
9.4	Déplacement en saltation des vésicules 7 (a) et 10 (b). Le cisaillement en (a) est de 1.3 s^{-1} . Le cisaillement en (b) est de 3.3 s^{-1}	111
9.5	Déplacements de vésicules en adhésion. Les régimes de déplacements sont découpés en suite de régimes à vitesse constante. Deux points rouges consécutifs délimitent un régime. (a) : vésicule 4, $\dot{\gamma} = 0.65 \text{ s}^{-1}$. (b) : vésicule 7, $\dot{\gamma} = 4.65 \text{ s}^{-1}$. (c) : vésicule 13, $\dot{\gamma} = 13 \text{ s}^{-1}$. (d) : vésicule 7, $\dot{\gamma} = 3.99 \text{ s}^{-1}$	113
9.6	(a) : vésicule 7, (b) : vésicule 14, (c) : vésicule 4. \circ : régime 1, \square : régime 2, \bullet : régime 3, \blacksquare : régime 4.	114
9.7	Déplacement d'une vésicule recouverte de streptavidine sur un tapis de biotine. Au début, la vésicule se déplace à vitesse constante puis, elle s'arrête de façon définitive.	115
9.8	Représentation schématique de la chambre d'écoulement de dimension $15.9 \times 9.9 \text{ mm}^2$. Les flèches indiquent le sens du flux et les ronds noirs représentent les billes. Après injection de billes, nous ne prenons en compte que les billes se trouvant dans la suite de fenêtres en pointillés.	118

9.9	(a) et (b) : une des fenêtres d'observation de la surface 1. (c) et (d) : une des fenêtres d'observation de la surface 4. (b) : billes restantes de (a) après ajout d'imidazole. (d) : billes restantes de (c) après ajout d'imidazole. (a) et (b) sont des images obtenues par une visualisation des billes en microscopie en champ clair alors que les images (c) et (d) ont été obtenues à l'aide du DIC.	119
9.10	Variation du pourcentage de billes attachées en fonction de la concentration en imidazole pour différentes surfaces	120
9.11	Variation du nombre de billes attachées en fonction du rayon pour les différentes surfaces.	121
9.12	Variation du nombre de billes attachées en fonction du paramètre de normalisation pour les différentes surfaces.	123
9.13	Variation du nombre de billes attachées en fonction du paramètre de normalisation pour les différentes surfaces.	124
9.14	Vue en RICM d'une bille d'agarose en adhésion	125
9.15	Représentation schématique du calcul de h , la distance séparant la bille de la surface.	126
9.16	Suivi d'une tache d'adhésion au cours du temps. La tache est repérée par le cercle blanc. L'intervalle de temps entre chaque image est de 1/18 s.	127
9.17	Evolution temporelle de la vitesse et de la distance séparant une bille de la surface	128
9.18	Histogramme de la vitesse de translation de la bille 3	129
9.19	Variation de la vitesse moyenne de déplacement en fonction du taux de cisaillement appliqué pour la bille 1.	129
9.20	Histogramme des hauteurs moyennes mesurées lors du déplacement d'une bille sans adhésion pour différents taux de cisaillement.	130
9.21	Variation de la hauteur moyenne en fonction du taux de cisaillement. La droite est un ajustement linéaire.	131
9.22	Variation de la vitesse de déplacement et de la vitesse théorique de Goldman en fonction de la hauteur mesurée.	131
9.23	Variation de la force de portance renormalisée en fonction de $(1-\nu)$, ν étant le taux de dégonflement.	132
9.24	Histogrammes des vitesses et des hauteurs pour les billes 2, 5, 4 et 1.	133
9.25	Histogrammes des vitesses pour la bille 5 pour deux taux de cisaillement. . .	133
9.26	Comparaison entre les vitesses mesurées (en bleu) et la vitesse théorique prédite par Goldman (en rouge) pour les billes 2, 5.	134
9.27	Variation temporelle de la vitesse de déplacement de la bille 2 (en rouge) et de sa vitesse de glissement (en bleu).	134
9.28	Variation de la vitesse moyenne de déplacement mesurée en fonction de la vitesse de glissement mesurée. On a reporté le critère de Goldman : $V_{\text{glissement}}/V > 0.4314$ qui équivaut à $V_{\text{glissement}} > 0.4314V$ qui équivaut à $V < 2.31V_{\text{glissement}}$. La droite noire a pour équation $V = 2.31V_{\text{glissement}}$	135

9.29	Variation des vitesses de déplacement pour lesquelles on a mesuré une vitesse de glissement en fonction de la hauteur. En rouge est représentée la vitesse théorique de Goldman, les carrés pleins correspondent à des vitesses de déplacement $< 2.31 V_{\text{glissement}}$ (il y a de l'adhésion spécifique) et les carrés ouverts correspondent à $V > 2.31 V_{\text{glissement}}$ (pas d'adhésion possible).	136
9.30	Variation des vitesses en fonction de la hauteur mesurée. En rouge, est tracée la courbe théorique de Goldman. (a) : vitesses de la bille 2. (b) : vitesses de la bille 4.	137
9.31	Exemples de déplacements de billes	139
9.32	Exemple du déplacement au cours du temps d'une bille de $24 \mu\text{m}$ de rayon soumise à un cisaillement de 15.9 s^{-1} et de la détermination des différents régimes. Pour des raisons de lisibilités, le commencement et la fin des régimes sont marqués par un carré rouge. Par exemple, l'encart montre neuf régimes.	140
9.33	Histogramme des vitesses	142
9.34	(a) : variation du pourcentage du nombre de régimes appartenant à V_+ , moyenné sur les rayons en fonction de la concentration en imidazole pour un cisaillement de 15.9 s^{-1} . Les pointillés représentent un ajustement des points en loi de puissance, la puissance étant de 2. (b) : \bullet : variation des vitesses médianes (appartenant à la population V_+) renormalisées par le taux de cisaillement, en fonction du rayon des billes. \square : vitesse de Goldman calculée pour une hauteur de 50 nm .	144
9.35	Variation du pourcentage du nombre de régimes dont les vitesses sont rangées dans la population V_+ en fonction du cisaillement pour une concentration en imidazole de 450 mM .	145
9.36	Variation du pourcentage des régimes appartenant à la population $V_{\text{arrêt}}$ en fonction du rayon des billes. Les ronds correspondent à un taux de cisaillement de 15.9 s^{-1} et les carrés correspondent à un taux de cisaillement de 34.9 s^{-1} . Les symboles en clair correspondent à une concentration en imidazole de 100 mM . Les symboles pleins correspondent à une concentration en imidazole de 200 mM .	145
9.37	(a) : variation de la vitesse médiane déterminée sur les histogrammes de billes appartenant à la population V_- . (b) : évolution du logarithme de la vitesse médiane moyennée sur les rayons en fonction du taux de cisaillement pour différentes concentrations d'imidazole. Pour les deux images : \circ : $[\text{Imi}] = 100 \text{ mM}$ et $\dot{\gamma} = 15.9 \text{ s}^{-1}$, \square : $[\text{Imi}] = 200 \text{ mM}$ et $\dot{\gamma} = 15.9 \text{ s}^{-1}$, \bullet : $[\text{Imi}] = 100 \text{ mM}$ et $\dot{\gamma} = 34.98 \text{ s}^{-1}$, \blacksquare : $[\text{Imi}] = 200 \text{ mM}$ et $\dot{\gamma} = 34.98 \text{ s}^{-1}$. \blacktriangle : $[\text{Imi}] = 450 \text{ mM}$ et $\dot{\gamma} = 3.9 \text{ s}^{-1}$.	146

Liste des tableaux

2.1	Valeur de a pour différents électrolytes	20
2.2	Valeurs tabulées de F_x^{s*} et T_y^{s*} pour une sphère sans mouvement dans un cisaillement	30
3.1	Tableau résumant les différents travaux sur la spectroscopie de force par AFM de la chélation du nickel par des histidines. (a) : [L. Schmitt et al., 2000], (b) : [M. Conti et al., 2000], (c) : [Kienberger et al., 2000].	48
5.1	Tableau présentant le nombre de molécules calculé à l'aide de la fonction d'autocorrélation (N_{AC}) et le nombre de molécules calculé par la méthode des fluctuations N_{FLU} , pour deux échantillonnages sur une lamelle recouverte du peptide AV20KH et sur deux lamelles recouvertes d'histidine-GFP.	70
5.2	Tableau présentant les concentrations maximales et minimales du nombre de molécules se trouvant sur une lamelle traitée avec le AV20KH et sur deux lamelles traitées avec de l'histidine GFP.	71
8.1	Paramètres expérimentaux des vésicules étudiées. L est le diamètre de l'aire de contact et R le rayon des vésicules.	96
9.1	Paramètres des vésicules. R est le rayon des vésicules, P est le poids des vésicules, $\Delta\rho$ est la différence de densité entre le fluide interne et le fluide externe, g est l'accélération gravitationnelle.	107
9.2	Force de portance renormalisée pour les vésicules 1 à 7.	110
9.3	Tableau regroupant pour les différentes vésicules en saltation : le cisaillement appliqué ($\dot{\gamma}$), les vitesses renormalisées avant et après un régime d'adhésion ferme et les hauteurs séparant les vésicules et la surface avant et après un régime d'adhésion ferme.	111
9.4	Paramètres expérimentaux pour les différentes surfaces étudiées : densité de billes, taux de cisaillement appliqués et surfaces étudiées.	117
9.5	Paramètres expérimentaux pour les billes en adhésion observées en RICM. R est le rayon et $\dot{\gamma}$ est le taux de cisaillement.	127
9.6	Vitesses moyennes du déplacement d'une bille sans adhésion en fonction du taux de cisaillement appliqué.	129

9.7	Vitesse et temps des régimes observés dans l'encart de la figure 9.32.	141
9.8	Tableau regroupant le pourcentage de régimes appartenant à V_+	143

Protocole de purification d'histidine-GFP

La Green Fluorescent Protein est clonée dans un vecteur pQE30 (Qiagen) et la surproduction a lieu dans la bactérie E.coli M15. Le plasmide est inséré dans les bactéries par choc thermique. Les bactéries sont placées à 4 °C pendant 20 minutes, puis à 45 °C pendant 30 à 45 s puis enfin à 4 °C pendant 5 minutes. Les bactéries sont alors préculturées sur la nuit dans un milieu contenant du LB (pour Luria Broth, le bouillon de culture des bactéries), de l'ampicilline à 100 µg/mL, du kanamycine à 50 µg/mL pour le maintien des plasmides. Ensuite, on réalise la culture dans 500 mL de ce même milieu à 37 °C sous agitation forte jusqu'à obtenir une densité optique (D.O.) à 600 nm de 0.6. La production de protéine est ensuite induite par l'ajout de 0.5 mM d'IPTG (IsoPropylThioGalactisial) pendant 3h à 30°C. Après centrifugation de la culture à 4°C, le culot bactérien est repris dans un tampon contenant du Tris à 20 mM, du NaCl à 500 mM et de l'imidazole à 5 mM le tout à un pH de 8. Un cocktail d'inhibiteurs de protéases est ajouté (1 mM de PMSF (phenylmethanesulphonylfluoride) et 1 µM de pepstatine et de leupeptine). avant de passages à la presse de FRENCH pour réaliser la lyse des bactéries.

La purification s'effectue sur une colonne Ni-NTA par chromatographie d'affinité également appelée IMAC pour Immobilised Metal Affinity Chromatography. Le groupement NTA est fixé de façon covalente à un support inerte (des billes poreuses de sépharose) et peut chélater des ions métalliques, en l'occurrence du nickel Ni²⁺. Ce nickel possèdera alors deux valences libres pouvant chélater les histidines (déprotonées à un pH de 8) des protéines. La GFP produite possède une étiquette de 6 histidines. Après lavage de la colonne avec un tampon de Tris-HCL et 500 mM de NaCl à un pH de 8, contenant des concentrations croissantes d'imidazole (20 mM, 40mM, 50 mM et 60 mM), on élue la protéine avec 300 mM d'imidazole.

Protocole de fonctionnalisation de AV20KH avec du FITC

Afin de vérifier la présence de nickel sur les vésicules, nous avons souhaité rendre fluorescent le peptide AV20KH. Nous avons choisi le FITC pour Fluorescein IsoThioCyanate de formule $C_{21}H_{11}NO_5S$ acheté chez Sigma¹, de masse molaire 389.4 g/mol ayant une longueur d'onde d'excitation de 492 nm et une longueur d'onde d'émission de 518 nm. Le FITC va réagir par son groupement isothiocyanate (N=C=S) avec la lysine du peptide. Nous allons donc effectuer un mélange équimolaire du peptide et du FITC. Le FITC a été dilué dans du Dimethyl Sulfoxide (DMSO) alors que le peptide fut dilué dans du PBS. Une mesure par densité optique D.O du peptide nous permet de remonter à sa concentration qui est de 0.5 mM. Le FITC se trouve lui à une concentration de 12 mM. Ainsi, si l'on prend 910 μ L de peptide à 0.5 mM et que l'on souhaite obtenir un mélange équimolaire de FITC - Peptide, sachant que le FITC est à 12 mM, il faudra rajouter $0.5 \times 910 / 12 = 37.5$ μ L de FITC au 910 μ L de peptide.

¹Référence F3651

Résumé :

L'adhésion est un processus fondamental qui influence le déclenchement et le déroulement des processus pathologiques, notamment concernant les cellules circulantes aux parois vasculaires (réaction inflammatoire dans le flux sanguin). Sa compréhension nécessite la connaissance des mécanismes biologiques impliqués mais aussi d'un cadre physique de description du mouvement sous flux d'objets déformables en interaction avec une paroi. Notre travail utilise des systèmes modèles (vésicules, billes) pour identifier le rôle de paramètres de l'adhésion (densité, mobilité des ligands membranaires, déformabilité) sur le mouvement. Le système d'interaction développé est la chélation entre un ion nickel et deux histidines. L'imidazole, partie complexante de l'histidine, va permettre de réguler la force de l'interaction. Nous avons décrit le mouvement des lipides membranaires sous flux dans le cas de vésicules en interaction forte. On a mis en évidence la présence d'un flux surfacique dépendant de la forme de l'objet et de la force de l'adhésion. En régulant l'adhésion spécifique faible de billes, nous montrons la spécificité de l'interaction, des phénomènes originaux de capture, de détachement et de déplacement en adhésion sous écoulement de cisaillement.

Mots-clés :

Adhésion spécifique, vésicules, hydrodynamique, bille d'agarose, chélation, Spectroscopie à corrélation de fluorescence, RICM, flux, chambre à flux

Abstract :

Adhesion is a fundamental process which influence the release and the behaviour of pathologist processes, such like circulating cells on blood vessels (inflammatory response). His understanding need knowledge of biological mechanisms but also a physical description of the movement of deformable objects under a shear flow, interacted with a wall. Our work use model systems (vesicles, beads) to identify the role of adhesion parameters (density, mobility of adhesion molecules and deformability of the object) on the movement. We develop a specific interaction : chelation of one nickel ion by two histidines. Imidazole, the complexant part of the histidine, is used to tune the interaction strenght. We described the movement of membranar lipids under flow when vesicles are under strong adhesion. We show the existence of a surfacic flow which depend of the shape of the vesicle and of the adhesion force. By tuning the specific interaction on beads, we show the specificity of the interaction, original phenomenon of capture, detachment and movement of beads under adhesion and under a shear flow.

Mots-clés :

Specific adhesion, vesicles, hydrodynamic, Agarose bead, chélation, Fluorescence Correlation Spectroscopy, Reflection Interference Contrast Microscopy, flow, flow chamber